

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nina KOLENC

**POMEN REDOKS POTENCIALA PRI
METABOLIZMU STREPTOMICET PRI RAZVOJU
BIOPROCESA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKUTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nina KOLENC

**POMEN REDOKS POTENCIALA PRI METABOLIZMU
STREPTOMICET PRI RAZVOJU BIOPROCESA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**IMPORTANCE OF REDOX POTENTIAL IN THE METABOLISM OF
STREPTOMYCETES IN BIOPROCESS DEVELOPMENT**

M.Sc. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek 2. stopnje univerzitetnega študija biotehnologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v podjetju Acies Bio d.o.o.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega podiplomskega študija biotehnologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Marin Berovič, za somentorja prof. dr. Hrvoje Petkovič in za recenzenta prof. dr. Aleš Podgornik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Marin BEROVIČ
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Oddelek za kemijsko procesno, okoljsko in biokemijsko inženirstvo

Član: prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Aleš PODGORNIK
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Oddelek za kemijsko procesno, okoljsko in biokemijsko inženirstvo

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nina Kolenc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 602.4: 577.182.62 (043.2)
KG eritromicin / biosinteza / antibiotik / *Saccharopolyspora erythraea* / gojišča / biopresi / optimizacija biopresesa / redoks potencial
AV KOLENC, Nina
SA BEROVIČ, Marin (mentor)/PETKOVIĆ, Hrvoje (somentor)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN POMEN REDOKS POTENCIALA PRI METABOLIZMU STREPTOMICET PRI RAZVOJU BIOPROCESA
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XIV, 64 str., 18 pregl., 24 sl., 1 pril., 59 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Razvoj biopresesa za produkциjo antibiotika je večplasten postopek optimizacije gojišč, priprave vcepkov ter vodenja biopresesa v bioreaktorju. V magistrski nalogi smo se osredotočili na produkcijsko optimizacijo eritromicina s produkcijskim organizmom *Saccharopolyspora erythraea*. Najprej smo ovrednotili različna sporulacijska, vegetativna in produkcijska gojišča na nivoju stresalnika ter izbrali najboljša gojišča za biosintezo eritromicina za eksperimente v bioreaktorjih. V bioreaktorjih smo nato primerjali enostopenjsko in dvostopenjsko pripravo (koncentracija biosintetiziranega eritromicina je bila 23 mg/L) vcepka ter glede na rezultate izbrali enostopenjsko pripravo vcepka zaradi boljše produkcijske efektivnosti. Nadaljevali smo s preučevanjem različne oskrbe s kisikom in dohranjevanjem z glukozo, s poudarkom na spremljjanju redoks potenciala ter zaključili, da sta ključnega pomena za biosintezo eritromicina. Producija je bila pri biopresisu z limitacijo s kisikom nizka (23 mg/L), medtem ko je bila produkcija eritromicina pri biopresisu vedenem pri maksimalnih pogojih mešanja 73 mg/l. Producija eritromicina pri biopresisu z dohranjevanjem glukoze je bila 72 mg/l. Spoznanja, ki smo jih pridobili na laboratorijskem nivoju, smo uporabili pri vodenju biopresesa v pilotnem merilu, ki smo ga vodili s konstatnim vzdrževanjem vrednosti pH, DO₂ ter konstantnim dohranjevanjem glukoze in spremljali povezavo med redoks potencialom ter drugimi biopresensimi parametri. Producija eritromicina pri biopresisu v pilotnem merilu se je začela 20 ur hitreje kot pri biopresesih v laboratorijskih bioreaktorjih. Specifična hitrost biosinteze eritromicina je znašala 78 mg/l/h. Iz rezultatov poskusov različnega vodenja biopresesov v bioreaktorju lahko zaključimo, da je vrednost redoks potenciala z ostalimi biopresensimi parametri (DO₂, vrednost pH, koncentracija prostih amonijevih ionov, koncentracija glukoze) pomemben pokazatelj poteka biopresesa in je lahko uporaben parameter pri razvoju biopresesa produkcije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 602.4: 577.182.62 (043.2)
CX erythromycin / biosynthesis / antibiotic / *Saccharopolyspora erythraea* / media / bioprocess / bioprocess optimisation / redox potential
AU KOLENC, Nina
AA BEROVIČ, Marin (supervisor)/PETKOVIĆ, Hrvoje (co-supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TI IMPORTANCE OF REDOX POTENTIAL IN THE METABOLISM OF STREPTOMYCETES IN BIOPROCESS DEVELOPMENT
DT M. Sc. Thesis (Masters Study Programmes)
NO XIV, 64 p., 18 tab., 24 fig., 1 ann., 59 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bioprocess development for production of antibiotics is a complex process of media development, seed culture preparation and bioprocess regulation. We have focused on the study of erythromycin biosynthesis, using wild type strain as well as high producing strain of *Saccharopolyspora erythraea*. Initially we evaluated different sporulation, seed and production media on shaker level, which resulted in the selection of the most suitable combination of media for erythromycin production in fermenter. In the next step, we carried out experiments where process development was carried out using one and two stage (erythromycin yield 23 mg/L) inoculum preparation compared. Based on the achieved erythromycin yield 42 mg/L, we selected one stage inoculum preparation process. During the optimization of production medium and fermentation process, effect of different culture conditions was evaluated, and we concluded that the intensity of aeration and introduction of glucose feeding during bioprocess had the most profound effect on antibiotic production. While following the value of redox potential was useful approach in process control. Erythromycin yield was low in bioprocess with oxygen limitation (23 mg/l), in bioprocess with maximal aeration the erythromycin yield was 73 mg/l, meanwhile erythromycin yield in bioprocess with glucose feeding was 72 mg/l. The bioprocess set in 5L laboratory bioreactors was then scaled to 100L vessel. We have optimized the fermentation process by constant regulation of pH, DO₂ and controlled feeding of glucose feeding and we also studied redox potential correlation with other bioprocess parameters. Specific speed of erythromycin biosynthesis was 78 mg/l/h. We found out that the redox potential value was very useful indicator of conditions in the culture of *S. erythraea* and can be applied for bioprocess development together with others bioprocess parameters such as DO₂, pH value, concentration of free ammonium ions and glucose concentration.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI AKTINOMICET	2
2.1.1 Morfologija in življenjski cikel aktinomicet	2
2.1.2 Proizvajalci antibiotika eritromicina	3
2.1.2.1 Bakterija <i>Aeromicrobium erythreum</i>	3
2.1.2.2 Nitasta bakterija <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	3
2.2 MAKROLIDNI ANTIBIOTIK ERITROMICIN.....	3
2.2.1 Odkrije eritromicina.....	3
2.3 BIOSINTEZA ERITROMICINA PRI AKTINOMICETAH	4
2.3.1 Genska skupina za biosintezo eritromicina	4
2.3.2 Stopnje biosinteze eritromicina	5
2.3.2.1 Biosinteza osnovnega poliketidnega ogrodja eritromicina s PKS	5
2.3.2.2 Zaključne stopnje v biosintezi eritromicina	6
2.4 BIOPROCESI ZA PROIZVODNJO ERITROMICINA	8
2.4.1 Sestava produkcijskega gojišča	8
2.4.1.1 Viri ogljika	8
2.4.1.2 Viri dušika.....	9
2.4.1.3 Viri fosforja.....	9
2.4.2 Različni biopresi za proizvodnjo eritromicina	9
2.5 REDOKS POTENCIAL KOT POMEMBEN PARAMETER ZA PRODUKCIJO ERITROMICINA.....	10

2.5.1	Teorija redoks potenciala	10
2.5.2	Merjenje redoks potenciala	12
2.5.2.1	Merjenje redoks potenciala z barvili	12
2.5.2.2	Merjenje redoks potenciala z elektrodami	12
2.5.3	Redoks potencial v biotehnologiji	12
3	MATERIALI IN METODE	14
3.1	MATERIALI.....	14
3.1.1	Uporabljene kemikalije	14
3.1.1.1	Delovni mikroorganizmi	15
3.1.2	Uporabljena gojišča	15
3.1.2.1	Priprava sporulacijskih gojišč	15
3.1.2.2	Priprava vegetativnih gojišč	17
3.1.2.3	Priprava produkcijskih gojišč	18
3.1.2.4	Gojišče za biološki test	20
3.1.2.5	Gojišče za preverjanje čistosti bioprocesa 2TY	20
3.1.3	Uporabljene naprave	21
3.1.4	Ostali pribor in material	22
3.1.4.1	Steklovina	22
3.1.4.2	Ostali material in oprema	22
3.2	METODE	22
3.2.1	Kultivacija streptomicete <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	22
3.2.1.1	Sporulacijska faza	22
3.2.1.2	Vegetativna faza	23
3.2.1.3	Produkcijska faza	24
3.2.2	Izvedba eksperimentov v laboratorijskih bioreaktorjih	24
3.2.2.1	Priprava vcepka	24
3.2.2.2	Priprava laboratorijskega bioreaktorja	24
3.2.2.3	Vodenje bioprocesa	25
3.2.2.4	Meritve vzorcev tekom bioprocesa	26
3.2.3	Določanje vsebnosti eritromicina	27
3.2.3.1	Ekstrakcija eritromicina	27

3.2.3.2	Izvedba biološkega testa	27
3.2.3.3	HPLC analiza	28
3.2.4	Statistična analiza pridobljenih podatkov	28
4	REZULTATI	29
4.1	REZULTATI OPTIMIZACIJE GOJIŠČ	29
4.1.1	Optimizacija sporulacijskih gojišč	29
4.1.2	Optimizacija vegetativnih in produktivnih gojišč	30
4.2	OPTIMIZACIJA BIOPROCESA ZA PRODUKCIJO ERITROMICINA V LABORATORIJSKEM BIOREAKTORJU	32
4.2.1	Testiranje priprave vcepka	33
4.2.1.1	Dvostopenjska priprava vcepka	34
4.2.1.2	Enostopenjska priprava vcepka.....	37
4.2.2	Vpliv oskrbe s kisikom na produkcijo eritromicina	39
4.2.2.1	Vodenje bioprocesa pri limitaciji s kisikom	39
4.2.2.2	Vodenje bioprocesa z dobro oskrbo s kisikom	42
4.2.3	Vpliv dohranjevanja glukoze na biosintezo eritromicina	45
4.3	REZULTATI BIOPROCESA V VEČJEM MERILU IN INDUSTRIJSKIH POGOJIH	47
5	RAZPRAVA	52
6	SKLEPI	58
7	POVZETEK	59
8	VIRI	60
ZAHVALA		
PRILOGA		

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Uporabljeni mikroorganizmi pri delu v laboratoriju	15
Pregl. 2: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-4 (Minas, 2005).	16
Pregl. 3: Sestava sporulacijskega gojišča z ovseno moko (Shirling in Gottlieb, 1966; Hamedi in sod., 2002, 2005, 2006; Rostamza in sod., 2008).	15
Pregl. 4: Sestava sporulacijskega gojišča CM6 (Kieser in sod., 2001).	16
Pregl. 5: Sestava sporulacijskega gojišča R2T20 (Aparicio in sod., 1996).	17
Pregl. 6: Sestava sporulacijskega gojišča PBG-L (Sambrook in Russel, 2001).	17
Pregl. 7: Sestava vegetativnega gojišča V1 (Minas, 2005).	18
Pregl. 8: Sestava vegetativnega gojišča NERV-3 (Hamedi in sod., 2002, 2006).	18
Pregl. 9: Sestava vegetativnega gojišča EVL (Kieser in sod., 2000).	18
Pregl. 10: Sestava produktivnega gojišča F1 (Minas, 2005).	19
Pregl. 11: Sestava produktivnega gojišča NERP-3 (Hamedi in sod., 2002; Rostamza in sod., 2008).	19
Pregl. 12: Sestava produktivnega gojišča NERP-6 (Hamedi in sod., 2005).	19
Pregl. 13: Sestava raztopine kovin v sledovih za produktivno gojišče NREP-6 (Hamedi in sod., 2005).....	20
Pregl. 14: Sestava produktivnega gojišča EFL (Kieser in sod., 2000).	20
Pregl. 15: Sestava trdnega gojišča ABA.....	20
Pregl. 16: Sestava trdnega 2TY gojišča (Sambrook in Russel, 2001).	20
Pregl. 17: Seznam naprav.	21
Pregl. 18: Rezultati preizkušanja različnih sporulacijskih gojišč pri naravnem in industrijskem sevu aktinomicete <i>Saccharopolyspora erythrea</i>	30

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel predstavnika aktinomicet <i>Streptomyces coelicolor</i> (Angert, 2005).	2
Slika 2: Struktura eritromicina A, B, C in D (Doumith in sod., 1999).	4
Slika 3: Mapa genov, ki so povezani z biosintezo eritromicina pri aktinomiceti <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (Staunton in Weissman, 2001).	5
Slika 4: Shema PKS multiencimskega kompleksa (Cane, 2010).	6
Slika 5: Biosinteзна pot eritromicina A (Chen in sod., 2008).	7
Slika 6: Redoks reakcija brez vidne izmenjave elektronov (Greenberg, 1998).	11
Slika 7: Zadovoljiva intenzivnost sporulacije aktinomicete <i>Saccharopolyspora erythraea</i> .	23
Slika 8: Kultura aktinomicete <i>Saccharopolyspora erythraea</i> , kjer ni zadovoljive sporulacije.	23
Slika 9: Bioreaktor Applikon z delovnim volumnom 4,8 L.	25
Slika 10: Rezultati produkcije eritromicina pri industrijskem sevu ABE006 aktinomicete <i>Saccharopolyspora erythraea</i> na različnih sporulacijskih, vegetativnih in produktivnih gojišč (na osi x so označena v vrstnem redu -sporulacijsko-vegetativno-produktivno gojišče).	31
Slika 11: Rezultati produkcije eritromicina pri divjem tipu seva <i>Saccharopolyspora erythraea</i> na različnih sporulacijskih, vegetativnih in produktivnih gojišč (na osi x so označena v vrstnem redu -sporulacijsko-vegetativno-produktivno gojišče).	32
Slika 12: Časovni potek bioprocessa z dvostopenjskim vcepkom ter postopnim dvigovanjem obratov in pretoka zraka, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotka raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja.	34
Slika 13: Časovni potek bioprocessa z dvostopenjskim vcepkom ter postopnim dvigovanjem obratov in pretoka zraka, ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, vrednosti PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov.	35
Slika 14: Časovni potek bioprocessa z enostopenjskim vcepkom ter postopnim dvigovanjem obratov in pretokom zraka, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotek raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja.	37

Slika 15: Časovni potek bioprocessa z enostopenjskim vcepkom ter postopnim dvigovanjem obratov in pretoka zraka, ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju; vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, vrednosti PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov. 38

Slika 16: Časovni potek bioprocessa z enostopenjskim vcepkom vodenem pri konstantni hitrosti mešanja 350 rpm in pretokom zraka (2,5 l/min), ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, odstotek raztopljenegakisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja. 40

Slika 17: Časovni potek bioprocessa z enostopenjskim vcepkom vodenem pri konstantni hitrosti mešanja 350 rpm in pretokom zraka (2,5 l/min), ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, odstotka PMV in koncentracije protih amonijevih ionov. 41

Slika 18: Časovni potek bioprocessa z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretoku zraka 6 L/min, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotka raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja. 42

Slika 19: Časovni potek bioprocessa z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min, ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, vrednosti PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov. 43

Slika 20: Časovni potek bioprocessa z enostopenjskim vcepkom, vodenem s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja ter pretoka zraka in dohranjevanjem glukoze (puščica) pri 35. uri bioprocessa, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotka raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja. 45

Slika 21: Časovni potek bioprocessa z enostopenjskim vcepkom, vodenem s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka in dohranjevanjem glukoze pri 35. uri bioprocessa (puščica), ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, vrednosti PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov. 46

Slika 22: Časovni potek bioprocessa v 100 L pilotnem bioreaktorju, vodenem s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka ter kontinuirno dohranjevanje vira ogljika in dušika, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotka raztopljenega kisika, odstotka raztopljenega ogljikovega dioksida, redoks potenciala in hitrosti mešanja. 48

Slika 23: Časovni potek bioprosesa v 100 L pilotnem bioreaktorju, vodenem s postopnim dvigovanjem obratov mešanja in pretoka zraka ter kontinuirno dohranjevanje z ogljikom in dušikom, ki je bil pridobljen z analizami vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov

50

Slika 24: Povzetek časovnih potekov normaliziranih vrednosti redoks potencialov iz vseh izpeljanih bioprosesov z enostopenjskim vcepkom.

55

KAZALO PRILOG

Priloga A 1: Sestava sporulacijskega gojišča SM MgCl₂ (Kieser in sod., 2000).

Priloga A 2: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-1 (El-Enshasy in sod., 2008).

Priloga A 3: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-2 (Elmahdi in sod., 2003).

Priloga A 4: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-5 (Mirjalili in sod., 1999).

Priloga A 5: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-6 (Wardell in Bushell, 1999).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a	območje med tekočino in plinom (cm^2/cm^3)
a_e	aktivnost elektronov
a_{ox}	aktivnost oksidantov
a_{red}	aktivnost reducentov
ACP	acil prenašalni protein
AT	aciltransferazna domena
C	povprečna koncentracija kisika v tekočini
C^*	nasičena koncentracija raztopljenega kisika (mg/l)
C_i	ravnotežna koncentracija kisika v tekoči fazi na fazni meji zrak - tekočina
C_L	izmerjena koncentracija raztopljenega kisika (mg/l)
CoA	koencim A
DEBS	deoksieritronolid B sintaza
DH	dehidratazna domena
DO	raztopljeni kisik
$\frac{dx}{dt}$	bilanca za spreminjanje koncentracije biomase
E	elektrodni potencial
ER	enoil reduktazna domena
E_h	oksidacijski potencial
E^0	standardni redoks potencial
F	Faradajeva konstanta ($96,42 \text{ kJ volt}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
FAS	Fatty Acid Synthase–sintaza maščobnih kislin
G nukleotid	gvanin nukleotid
GSF	pretok zraka (l/min)
HeLa	Je celični tip neumrljive celične linije, ki se uporablja v raziskavah.
HPLC	high performance liquid chromatography ozioroma tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
k_l	koeficient prenosa kisika (cm/h)
k_{la}	volumetrični koeficient prenosa kisika (h^{-1})

KR	ketoreduktazna domena
KS	ketosintazna domena
N	število vrtlajev mešala
NDP	nukleozid difosfat
N_{O_2}	razmerje prenosa kisika (mg O ₂ /l h)
ORP	oksidacijsko redukcijski potencial
ORF	odprt bralni okvir je del DNK, ki se začne z začetnim kodonom in konča s stop kodonom ter je dovolj dolga, da kodira posamezni protein
P	moč potrebna za mešanje
PKS	poliketid sintaza
PMV	parcialni volumen micelija (packed micelium volume) (%)
ppm	delež na milijon (parts per million)
R	konstanta plina (8011 JK ⁻¹)
rpm	število vrtlajev na minuto (rotation per minute)
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
T	temperatura (°K)
TCA	tricarboxylic acid cycle-cikel trikarboksilnih kislin, poznan tudi kot Krebsov cikel
TE	tioesterazna domena
t_{mix}	čas pomešanja
V	volumen prezračevane brozge
V_{ox}	stehiometrični koeficient oksidacije
V_{red}	stehiometrični koeficient redukcije
W_0	snovni tok kisika
qO_2	razmerje specifičnega prevzema kisika (mol O ₂ /g-h)
X	biomasa (g/l)
Y_{X/O_2}	izkoristek biomase glede na kisik
Φ/ND^3	aeracijsko število
Φ	volumski pretok zraka
6dEB	6 – deoksieritronolid B

1 UVOD

Namen našega dela je bil podrobneje preučiti produkcijo makrolidnega antibiotika v laboratorijskih pogojih in vpliv pogojev vodenja bioprocessa v bioreaktorju, ter kako ta spoznanja uporabiti pri postopku razvoja bioprocessa. Še posebno nas je zanimala tvorba biomase v začetnih stopnjah bioprocessa in na vzdrževanje biomase produkcijskega mikroorganizma v končnih stopnjah bioprocessa.

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

- Submerzna aerobna produkcija streptomacetne biomase in biosinteza ciljnih metabolitov v mešalnem bioreaktorju je odvisna od pogojev vodenja bioprocessa.
- Z ozirom na meritve metabolnega redoks potenciala bomo ugotovili s katerimi procesnimi parametri (parcialni tlak kisika, parcialni tlak CO₂, prezračevanje, pH, mešanje) je mogoče vplivati na regulacijo celičnega metabolizma in s tem na optimizacijo procesa ter povišanja koncentracije produkta.

Razvoj bioprocessa za produkcijo makrolidnega antibiotika je večplasten postopek optimizacije gojišča, priprave vcepka ter vodenja bioprocessa v bioreaktorju. V tej magistrski nalogi smo se osredotočili na produkcijo antibiotika eritromicina s producijskim organizmom *Saccharopolyspora erythraea*, ki je filamentozna bakterija. Vendar produkcija antibiotika ni odvisna le od faze rasti, ampak tudi od različnih okoljskih in fizioloških dejavnikov. Tako smo najprej določili optimalno sestavo gojišča za produkcijo eritromicina na laboratorijskem nivoju in najboljši način priprave vcepka za kultivacijo v bioreaktorju. Sledili so poskusi optimizacije vodenja bioprocessa v 5L bioreaktorjih pri različnih bioprocenskih parametrih, s poudarkom na spremljanju redoks potenciala. Tako pridobljeno znanje iz poskusov na laboratorijskih bioreaktorjih smo nato uporabili pri procesu optimizacije produkcije eritromicina v pilotnem bioreaktorju.

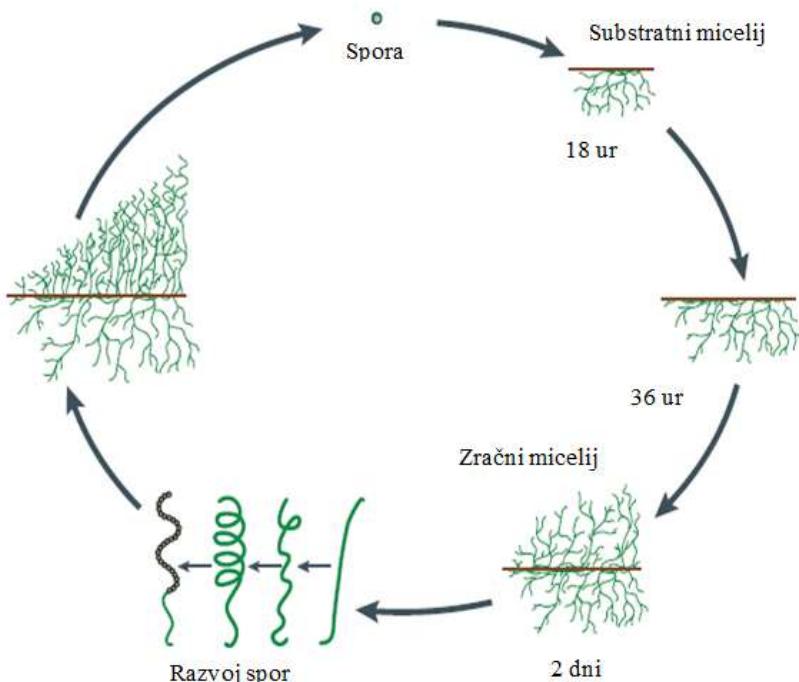
2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI AKTINOMICET

Izraz aerobne aktinomicete je neformalna oznaka za bakterije, ki pripadajo redu Actinomycetales. V začetku so bili organizmi tega reda klasificirani v glive saj oblikujejo zračne hife, ki so značilnost predvsem nitastih gliv. Vendar so kasneje na podlagi sestave njihove celične stene, in kasneje tudi vse drugih lastnosti ti mikroorganizmi povsem nedvoumno klasificirani v bakterije (McNeil in sod., 1994).

2.1.1 Morfologija in življenjski cikel aktinomicet

Za nitaste aktinomicete, kamor pripadajo tudi bakterije rodu *Saccharopolyspora sp.* Je značilna kompleksna morfološka diferenciacija. Fazo rasi lahko delimo v dve stopnji, rast substratnega in zračnega micelija (Slika 1). V prvi fazi kalitve spor so vidne hife, ki se razvijejo v primarni ali substratni micelij. Ko primarni (substratni) micelij doseže določeno stopnjo razvoja, se pojavi aglomerati hif iz katerih zrastejo novi celični elementi, ki se podaljšajo in zrastejo v sekundarni ali zračni micelij, na katerem se nato razvijejo spore (Klienberger, 1947). Zračni micelij in spore se navadno izoblikujejo glede na pomanjkanje hraniil (Angert, 2005).



Slika 1: Življenjski cikel predstavnika aktinomicet *Streptomyces coelicolor* (Angert, 2005).

2.1.2 Proizvajalci antibiotika eritromicina

Poznana sta vsaj dva pomembnejša proizvajalca eritromicina A in sicer *Saccharopolyspora erythraea* in *Aeromicrobium erythreum*. Heterologno izražanje eritromicina C je bila pokazana tudi v bakteriji *Escherichia coli* (Peirú in sod., 2005) in *Streptomyces lividans* (Stanzak in sod., 1986).

2.1.2.1 Bakterija *Aeromicrobium erythreum*

Razen bakterije *S. erythraea* je bakterija *Aeromicrobium erythreum* verjetno edina do sedaj znana nefilamentozna bakterija, ki proizvaja makrolidni antibiotik eritromicin A. Od ostalih bakterij, ki proizvajajo makrolidne antibiotike, se razlikuje v tem, da ne tvori spor in proizvaja eritromicin med rastjo (Miller in sod., 1991).

2.1.2.2 Nitasta bakterija *Saccharopolyspora erythraea*

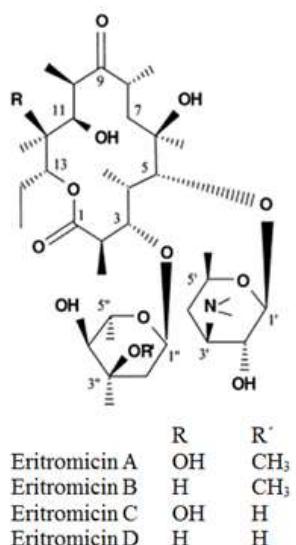
Bakterija *Saccharopolyspora erythraea* je gram pozitivna filamentozna aktinomiceta, ki služi kot modelni mikroorganizem za študijo biosinteze antibiotikov poliketidnega izvora že več desetletij (Marcellin in sod., 2013). Aktinomiceta *S. erythraea* spada v rod *Saccharopolyspora* in oblikuje običajno kratke verige spor. Substratni micelij je od nežno rumene do rdečkasto rjave barve, kar je odvisno od gojišča. Viden je tudi bel zračni micelij (Labeda, 1987). Za *S. erythraea* je značilen kompleksen življenjski cikel, kjer začetni fazi rasti sledi prehodno obdobje, znano kot metabolni preklop, kateremu sledi sekundarna faza rasti (Marcellin in sod., 2013). *S. erythraea* se uporablja za industrijsko produkcijo eritromicina, ki se uporablja za zdravljenje bolezni respiratornega sistema, ki so povzročene z gram pozitivnimi bakterijami. Deluje tudi na nekatere gram negativne bakterije (El-Enshasy in sod., 2007).

2.2 MAKROLIDNI ANTIBIOTIK ERITROMICIN

2.2.1 Odkrije eritromicina

Eritromicin pripada v skupino 14-členskih makrolidnih antibiotikov. To so eritromicin A, B, C in D (Slika 2). Eritromicin A je polihidroksiketonolakton z molekulsko formulo $C_{37}H_{67}NO_{13}$, ki je bil prvič izoliran iz tekoče kulture seva *S. erythraea*, pridobljene iz filipinske zemlje v letu 1952 (Wiley in sod., 1957b). Sledila je identifikacija eritromicina B v letu 1954 (Mironov in sod., 2004), ki ima molekulsko formulo $C_{37}H_{71}NO_{12}$ (Wiley in sod., 1957c). Struktura eritromicina A je bila opisana v letu 1957 in celotna stereokemija s pomočjo rentgenske kristalografije v letu 1965 (Wiley in sod., 1957c). Eritromicin B in A imata zelo podobne lastnosti (Slika 2), osnovna razlika med njima je večja stabilnost eritromicina A v kislem okolju (Wiley in sod., 1957c). Eritromicin C (z molekulsko

formulo $C_{36}H_{85}NO_{13}$) pa so odkrili s papirno kromatografijo, kjer je bil najhitreje premikajoča se komponenta. Drugače pa je eritromicin C podoben eritromicinu A in B (Slika 2) (Wiley in sod., 1957a). Eritromicin D, je bil izoliran iz ostanka tekočine po kristalizaciji eritromicina A, je strukturno soroden tako eritromicinu B (laktonsko ogrodje) kot tudi C (dodani sladkorji) in je ključni intermediat za njuno biosintezo. Antibakterijska aktivnost eritromicina D je polovična v primerjavi z eritromicinom A (Majer in sod., 1977).



Slika 2: Struktura eritromicina A, B, C in D (Doumith in sod., 1999).

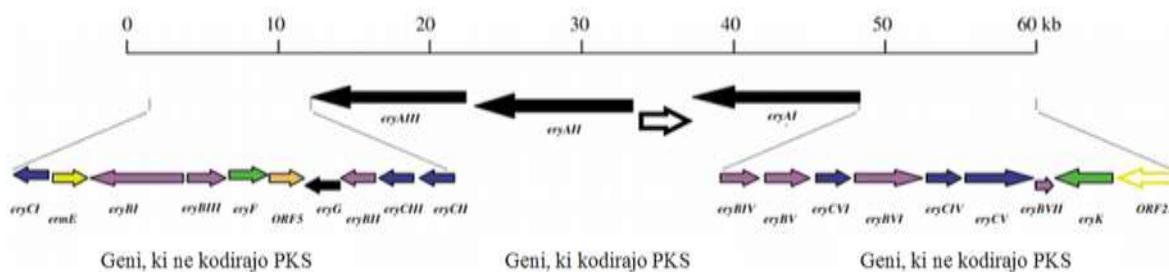
2.3 BIOSINTEZA ERITROMICINA PRI AKTINOMICETAH

Producija eritromicina je odvisna od faze rasti (Bibb, 1996), vendar na biosintezo vplivajo tudi številni okoljski in fiziološki dejavniki (Bibb, 2005). Točne vloge poliketidov v življenskem ciklu proizvodnih organizmov niso poznane, vendar veliko število le teh služi kot kemična obramba, kar omogoči kompetitivno prednost producentu (Baerson in Rimando, 2007).

2.3.1 Genska skupina za biosintezo eritromicina

Genom aktinomicete *S. erythrea* vsebuje 8.212.805 baznih parov, ki kodirajo 7.264 potencialnih genov. Genom je krožen, enako kot pri patogenih aktinomicetah *Mycobacterium tuberculosis* in *Corynebacterium diphtheriae*, vendar primerjiv po velikosti linearnega genoma aktinomicet *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Streptomyces avermitilis*. Vsebuje najmanj 25 genskih skupin za produkcijo različnih sekundarnih metabolitov, ki sicer niso nujni za rast, vendar omogočajo prednost aktinomicet pred ostalimi mikroorganizmi v prsti (Oliynyk in sod., 2007).

Geni odgovorni za biosintezo eritromicina so združeni v gensko skupino na kromosomu *S. erythraea* in se lahko delijo na tiste, ki so odgovorni za tvorbo poliketidnega skeleta, maktolaktona 6-deoksieritronolid B (6-dEB) (*eryAI*, *eryAII* in *eryAIII*), biosintezo in pritrjevanje deoksisladkorjev (*eryBV* in *eryCIII*) in dodatne modifikacije makrolaktonskega obroča (*eryF*) in glikozidov L-mikaroze in D-desozamina (*eryB* in *eryC*) ter rezistenco na eritromicin (*oleB* in *oleC*) (Zhang in sod., 2010). Genska skupina za biosintezo eritromicina A tako vsebuje 20 genov (Slika 3). Dodatni trije geni kodirajo encime za modifikacije 6-dEB, kot tudi rRNK metilazo za rezistenco na eritromicin (Slika 3). V eritromicinski genski skupini sta locirana tudi dva odprta bralna okvirja (ORF) in sicer *eryBI*, ki ni ključen za biosintezo eritromicina A ter *orf5*, ki zapisuje domnevno tioesterazo tipa II (Reeves in sod., 1999) (Slika 3). Skupina genov *eryB* so vključeni v biosintezo in pritrđitev L-mikaroze. Skupina genov *eryC* pa so vključeni v biosintezo in pritrđitev drugega sladkorja (D-desozamina) v eritromicinski molekuli (Summers in sod., 1997).



Slika 3: Mapa genov, ki so povezani z biosintezo eritromicina pri aktinomiceti *Saccharopolyspora erythraea* (Staunton in Weissman, 2001).

2.3.2 Stopnje biosinteze eritromicina

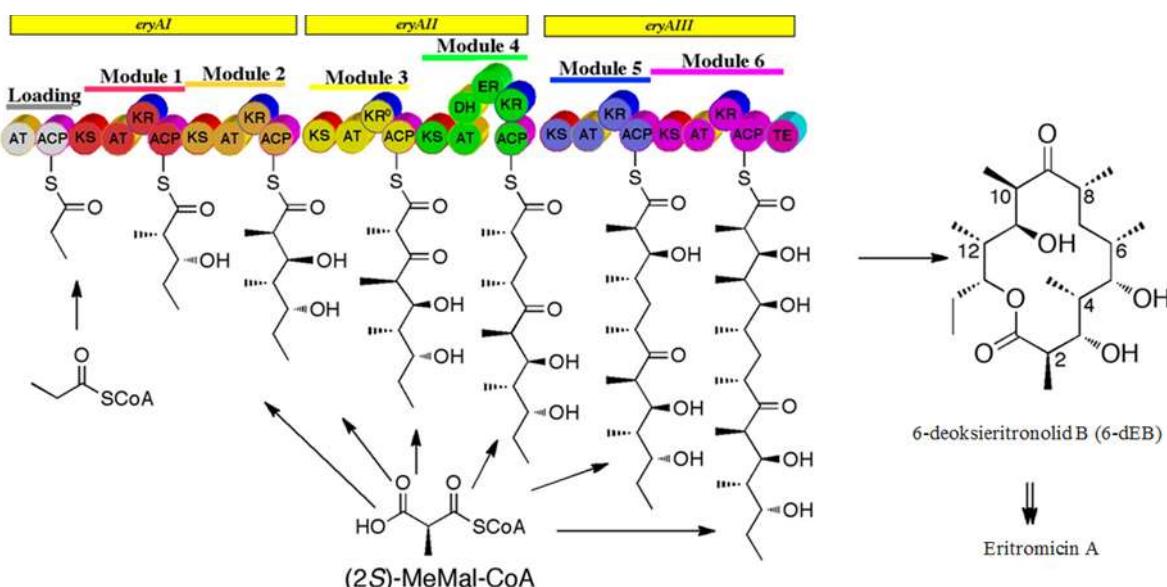
Biosinteza eritromicina A se lahko delita v dve fazih, in sicer na zgodnje stopnje biosinteze (biosintezo s PKS) in pozne stopnje biosinteze (post-PKS biosintezo) (Mironov in sod., 2004). V prvi stopnji poliketid sintaza (PKS) katalizira sekvenčno kondenzacijo gradbenih enot do nastanka prvega encimsko prostega intermediata, 6-deoksieritronolida (6-dEB) (Slika 4). V drugi fazi (post-PKS biosinteze) podleže 6-dEB modifikacijam z encimi, kot so regiospecifične hiroksilaze, glukozil-transferaze in metil-transferaze do končnega produkta eritromicina A (Slika 5) (Stauton in Wilkinson, 1997).

2.3.2.1 Biosinteza osnovnega poliketidnega ogrodja eritromicina s PKS

Encimski kompleksi, ki omogoči sintezo eritromicinskega ogrodja se imenuje poliketid sintaza (PKS). Tip I PKS so sestavljene iz različnih modulov (proteinskih kompleksov) z velikimi multifunkcionalnimi podenotami proteinov s številnimi aktivnimi mesti za biosintezo poliketidne molekule. Najbolj preučena je modularna 6-deoksieritronolid B

sintaza (DEBS) pri *S. erythraea*, ki kodira biosintezo aglikonskega ogrodja antibiotika eritromicina A. Biosinteza eritromicina se začne s kondenzacijo začetne enote propionil-CoA in nadaljuje z dekarboksilativno kondenzacijo šestih podaljševalnih enot-metilmalonil-CoA. Ponavljajoče dekarboksilativne kondenzacije omogočijo podaljševanje poliketidne ogljikove verige (Baerson in Rimando, 2007).

Geni *eryAI*, *eryAII* in *eryAIII* zapisujejo velike (> 300 aminokislin) multifunkcionalne proteine, t.i. module. Poimenovali so jih DEBS1, DEBS2 in DEBS3 (Slika 4). Moduli vsebujejo katalitične domene. V genski skupini PKS je šest modulov, ki vsebujejo 6 ketosintaznih (KS) domen, eno za vsak korak podaljševanja verige. Vsaki KS domeni sledi set dodatnih domen, ki se ujemajo z enim ciklom podaljševanja verige: set vključuje dve esencialni domeni, AT (aciltransferazna) in ACP (acil prenašalni protein) ter set opcijskih domen, ketoreduktazno (KR), dehidratazno (DH), enoil reduktazno (ER) in tioesterazno (TE) domeno, za različne modifikacije keto skupine (Cane, 2010). PKS intermediati tako lahko imajo nereduirane keto skupine v verigi, hidroksilne skupine, dvojne vezi ali popolnoma reducirane alkilne skupine (Baerson in Rimando, 2007). Biosintezni intermediati ostanejo vezani na PKS preko celotne sinteze sekvence s tioesterskimi vezmi (Stauton in Wilkinson, 1997). Zadnji korak je ciklizacija poliketidne verige (Mironov in sod., 2004).

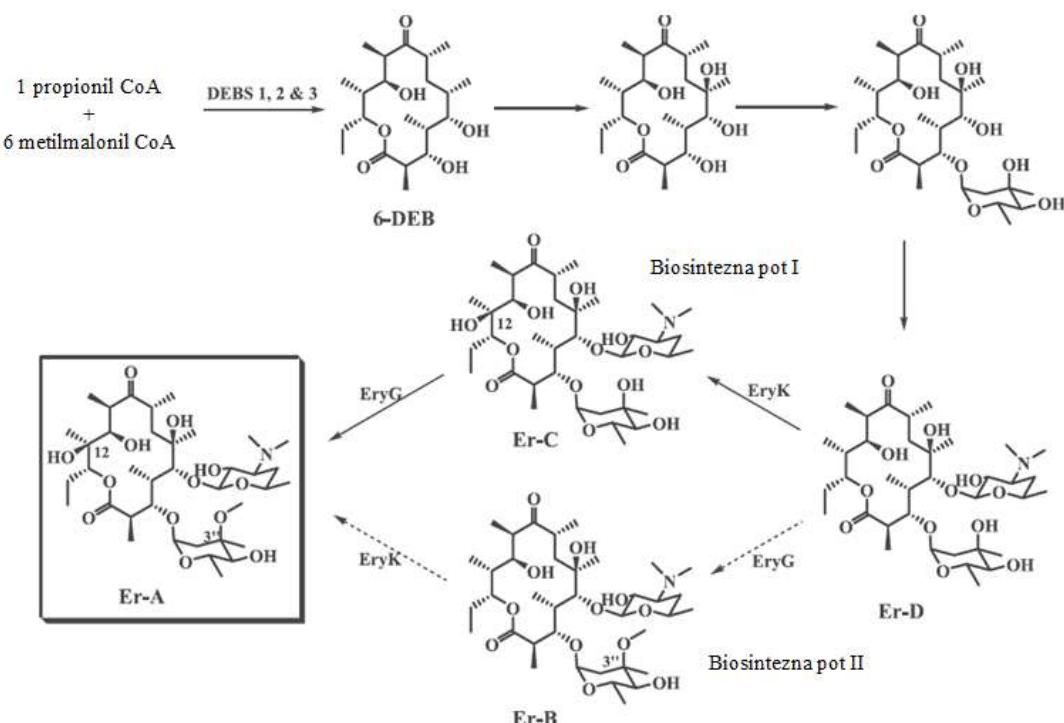


Slika 4: Shema PKS multiencimskega kompleksa (Cane, 2010).

2.3.2.2 Zaključne stopnje v biosintezi eritromicina

Po sprostitvi osnovnega poliketidne verige iz PKS kompleksa pride do ciklizacije, tvorbe makrolidnega obroča, ki se dodatno modificira, t.i. post-PKS modifikacija 6-DEB. Te

pozne modifikacije doprinesejo k biološki aktivnosti molekule, ob enem pa omogočajo dodaten vir strukturne raznolikosti v poliketidni biosintezi (Stauton in Weissman, 2001). Najprej se 6-dEB hidroksilira na poziciji C6. V naslednjem koraku se pritrdi L-mikaroza na C3 hidroksilno skupino, zatem pa aminosladkor D-dezozamin na C5 hidroksilno skupino in tako nastane eritromicin D, prvi intermediat z antibiotično aktivnostjo (Slika 5). Na tej točki se lahko biosintezna pot eritromicina A razveja in sicer, lahko se izvede hidroksilacija na C-12 poziciji aglikonske molekule, katalizirana s strani encima EryK in nastane eritromicin B. Druga možnost pa je metilacija na poziciji C-3 mikarozne, ki je katalizirana s strani encima EryG in tako nastane eritromicin C (Slika 5). Encim EryK ima 1200–1900 krat večjo preferenco za eritromicin D kot za eritromicin B, zato je pot preko hidroksilacije, ki ji sledi metilacija preferenčna (Biosintezna pot I - slika 5) (Chen in sod., 2008).



Slika 5: Biosintezna pot eritromicina A (Chen in sod., 2008).

2.4 BIOPROCESI ZA PROIZVODNJO ERITROMICINA

Leta 1952 je bil eritromicin A prvič izoliran iz kulture seva *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. V tem času je sev *S. erythraea* NRRL2338 proizvajal 0,25 – 1 g/L eritromicina, kar je bilo odvisno od pogojev v produkcijski fazi procesa. Od takrat, se je produkcija eritromicina povečala za 10 – 13 krat preko izboljševanja seva in optimizacije procesa (Minas, 2005).

2.4.1 Sestava produkcijskega gojišča

Sestava gojišča igra pomembno vlogo v produktivnosti sekundarnih metabolitov, cena surovin pa vpliva na ceno končnega produkta (Hamedi in sod., 2004). Glede na sestavo gojišča je produkcija eritromicina močno regulirana z vrsto in koncentracijo vira ogljika, dušika, fosforja, maščob in mikro elementov (El-Enshasy in sod., 2008).

2.4.1.1 Viri ogljika

Različni viri ogljika služijo kot vir gradbenih elementov organizma ter kot vir energije, ki omogoča normalno delovanje celičnih procesov in biosintezo metabolitov (Perdih, 1996). Pri bakterijah in ostalih mikroorganizmih je glukoza pogosto primeren vir ogljika za rast, vendar negativno vpliva na tvorbo sekundarnih metabolitov-antibiotikov (Sánchez in sod., 2010).

Ena izmed lastnosti sekundarnega metabolizma je počasna rast mikroorganizma. Tako nizke koncentracije primarnega vira ogljika v gojišču omogočijo počasno rast z minimalnim vplivom na produkcijo antibiotika (Sánchez in sod., 2010). Viri ogljika se v produkcijskih gojiščih večinoma uporabljajo v relativno visokih koncentracijah v primerjavi z ostalimi komponentami gojišča, zato na njihov izbor vpliva tudi ekonomika procesa. V industrijskih bioprocesih se uporabljajo različni viri ogljika kot so npr. melase, škrob, olja in drugi cenejši viri kompleksnega ogljika kot zamenjava za glukozo. Melasa sladkornega trsa vsebuje mešanico monosaharidov in polisaharidov ter je ekonomsko ugodna, zato se široko uporablja v industriji za produkcijo primarnih in sekundarnih metabolitov (El-Enshasy in sod., 2008). Rastlinsko olje se pogosto uporablja v gojiščih za produkcijo sekundarnih metabolitov kot vir ogljika. Hamedi in sod. (2004) so testirali različna rastlinska olja (sončnično, olje, lešnikovo olje, sojino olje, olje oljne ogrščice, sezamovo olje, kokosovo in ostala) z namenom povisjanja produkcije eritromicina. Mirjalili in sod. (1999) so z dodatkom olja oljne ogrščice dobili povečano produkcijo eritromicina brez negativnega vpliva na rast mikroorganizma.

Razmerje med ogljikom in dušikom (30:1) v gojišču pa je kritični faktor za celično rast in dobro produkcijo metabolitov (El-Enshasy in sod., 2008).

2.4.1.2 Viri dušika

Sojina moka, koruzna namakalna vodica (CSL), kvasni ekstrakt in amonijeve soli se najpogosteje uporabljajo kot viri dušika pri industrijski produkciji eritromicina (Zou in sod., 2009, Chen in sod., 2013b). V prisotnosti presežka vira dušika se zniža količina proizvedenega antibiotika (Zou in sod., 2009). Vir dušika tudi vpliva na viskoznost bioprosesne kulture in porabo glukoze v procesu produkcije eritromicina. Amonijev sulfat in amonijev klorid sta soli, ki pozitivno vplivata na produkcijo eritromicina. Druge amonijeve soli kot npr. amonijev oksalat, nitrat in karbonat pa omogočajo boljšo celično rast na račun produkcije antibiotika (El-Enshasy in sod., 2008). S kontrolo porabe amonijevega sulfata se lahko zniža viskoznost brozge in poraba glukoze, medtem ko amonijev fosfat nima pomembnejšega vpliva na produkcijo eritromicina (Chen in sod., 2013b).

2.4.1.3 Viri fosforja

Vir fosforja tudi pomembno vpliva na biosintezo eritromicina. Minimalna količina fosforja je potrebna, da metabolizem deluje, medtem ko višja začetna koncentracija KH_2PO_4 negativno vpliva na produkcijo antibiotika (Potvin in Péringer, 1993).

2.4.2 Različni bioprosesi za proizvodnjo eritromicina

Najbolj pogosti bioproses za industrijsko produkcijo eritromicina je submerzna kultivacija aktinomicete *S. erythraea* v mešalnem bioreaktorju s prezračevanjem (Chen in sod., 2013a). Vcepek se ponavadi pripravlja v najmanj dveh fazah, kjer se potem vcepek iz druge faze (10 % volumna produksijskega gojišča) uporabi za produksijsko fazo v bioreaktorjih (Minas, 2005).

Vzdrževanje optimalnih pogojev za tvorbo produkta v kompleksnem okolju bioreaktorja zahteva kontrolo vrednosti pH, temperature in raztopljenega kisika (s kontrolo hitrosti mešanja in prezračevanja) (Shuler in Kargi, 2008). Bioproses se vodi pri 30 – 34 °C (Wardell in Bushell, 1999; Chen in sod., 2013a; El-Enshasy in sod., 2008; Minas, 2005) v območju 30 – 60 % raztopljenega kisika (Wardell in Bushell, 1999; Chen in sod., 2013b) in pH regulacijo pri vrednosti 7,0 (Elmahdi in sod., 2003; Mirjalili in sod., 1999).

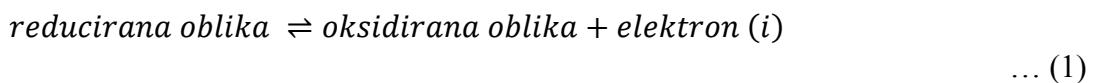
Poleg zgoraj omenjenega vodenja bioprosesov, se za industrijsko produkcijo eritromicina uporablja več načinov dohranjevanja različnih substratov. V času poteka bioprosesa se lahko dohranjuje z glukozo, n-propanolom, dekstrinom, amonijevim sulfatom, oljem, ipd. Glukoza v visokih koncentracijah zavira produkcijo eritromicina, vendar v nizkih koncentracijah lahko stimulira porabo propanola in visoko produkcijo eritromicina. Chen in sod. (2013a) so tudi ugotovili, da način dohranjevanja glukoze glede na vrednost pH

procesne brozge nima zaviralnega učinka na produkcijo eritromicina. V nasprotju z glukozo je n-propanol bolj direktno povezan s sintezo metilmalonil-CoA, saj se propanol najprej preoblikuje v propionil-CoA, propionil-CoA pa se s propionil-CoA karboksilazo in metilmalonil-CoA transkarboksilazo transformira v metilmalonil-CoA, ki je osnovni gradnik 6-dEB. Visoka poraba n-propanola naj bi tako vodila v boljšo sintezo etiromicina.

2.5 REDOKS POTENCIJAL KOT POMEMBEN PARAMETER ZA PRODUKCIJO ERITROMICINA

2.5.1 Teorija redoks potenciala

Oksidacija je proces v katerem snov odda elektrone, redukcija pa je definirana kot reverzni proces oksidacije. V sistemu reakcije oksidacije in redukcije težijo k ravnotežju, ko se ena snov oksidira (oddaja elektrone), se druga reducira (sprejme elektrone). Povezava med redukcijo in oksidacijo je lahko zapisana kot (Jacob, 1970):

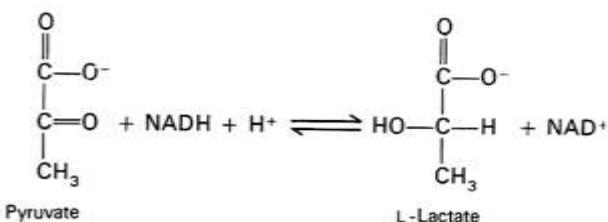


Redoks reakcije so neprekinjeni reduksijski in oksidijski procesi. Ker prosti elektroni ne obstajajo v opazni koncentraciji, so reakcije redukcije in oksidacije vedno v paru, komplementarne druga drugi saj ena reakcija sprosti toliko elektronov, kot jih druga porabi (Berovič, 1987).

Redoks potencial opišemo z Nernstovo enačbo (Enačba 2). Vrednosti redoks potenciala so odvisne od razmerja aktivnosti oksidiranih in reduciranih komponent določene substance, od števila elektronov vključenih v redoks reakcijo in od konstante potenciala redoks sistema E_0 . E^0 je standardni potencial, ki bi ga dosegli v primeru, kadar bi bile vse aktivnosti produktov in reaktantov (Kukec in sod., 2002).

$$E_h = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{\Sigma a_{ox}}{\Sigma a_{red}} \quad \dots (2)$$

Poznamo dva tipa redoks reakcij: prvi je primer reakcije v kateri se premik elektronov zgodi zaradi sprememb v ionskih vrednostih. Drugi primer redoks reakcije (Slika 6) je primer, kjer se reakcija izvede brez vidne izmenjave elektronov. Namesto tega se redoks reakcija izvede kot rezultat prenosa vodikovih atomov. Medtem, ko se prvi primer redoks reakcije dogodi bolj pogosto izven celice, je drugi primer pogost v celici. Večina redoks reakcij v celici se izvede ne kot izmenjava elektronov, ki spremenijo valenčno število, ampak kot produkcija energijsko bogatih reducirajočih reagentov v obliki $\text{NADH}+\text{H}^+$ ali FADH_2 (Greenberg, 1998).



Slika 6: Redoks reakcija brez vidne izmenjave elektronov (Greenberg, 1998).

Ko se izmenjava vodikovih elektronov ne izvede, je redoks reakcija neodvisna od vrednosti pH, ko vodikovi atomi igrajo ključno vlogo v redoks reakcijah, so te pH-odvisne. Relativna koncentracija vodikovih ionov ob tem igra pomembno vlogo v celotnemu redoks potencialu. Tako je lahko Nernstova enačba rešena z direktno menjavo vodikovih elektronov:

$$E = E^0 + 2,3 \frac{RT}{nF} \ln \frac{(H^+)}{(H_2)} \quad \dots (3)$$

Ko je Nernstova enačba izražena v zgornji obliki (Eqačba 3), je logaritem koncentracije vodikovih ionov enak pH-ju (Greenberg, 1998). Redoks potencial merjene snovi, ali substrata, v odvisnosti od pH vrednosti je izražen v Kjaergaardovi enačbi (Berovič, 1987):

$$E_h = E_{O_2/H_2O} + \frac{RT}{4F} \ln a_{O_2} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot pH \quad \dots (4)$$

Informacijo o redoks potencialu pri oksidacijsko-reduksijskih reakcijah nam da Nernstova enačba. Vendar za kompleksne sisteme, kjer je več oksidantov in reducentov velja:

$$\nu_1 S_1 + \cdots + \nu_i S_i + z e^- \leftrightarrow \nu_j S_j + \cdots + \nu_k S_k \quad \dots (5)$$

In Nernstova enačba se zapise:

$$E_h = E^o + \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{\prod_i a_{ox}^{\nu_{ox}}}{\prod_i a_{red}^{\nu_{red}}} \right) \quad \dots (6)$$

$\prod_i a_i^{\nu_i} \equiv a_{S_1}^{\nu_1} \cdot a_{S_2}^{\nu_2} \cdots a_{S_i}^{\nu_i}$ - produkt aktivnosti vseh prisotnih oksidantov oziroma reducentov.

2.5.2 Merjenje redoks potenciala

V principu obstajata dve možnosti merjenja redoks potenciala, z redoks barvili in z elektrodami (Jacob, 1970).

2.5.2.1 Merjenje redoks potenciala z barvili

Uporaba redoks barvil je omejena z več faktorji. Barvila lahko vplivajo na reakcije in spremenijo ravnotežja saj delujejo kot sprejemniki elektronov, sodelujejo v redoks reakcijah, kot intermediatni nosilci in katalizirajo biološke oksidacije, ali inhibirajo reakcije. Barvila lahko tudi delujejo toksično na mikroorganizme (Jacob, 1970).

Z redoks barvili se določi redoks stanje in redoks lastnosti kulture mikroorganizmov ter hitrosti redukcije barvil z mikroorganizmi. Lahko tudi pridobi splošno znanje o kapaciteti reducirajočih sistemov, vendar se morajo za točne meritve redoks potenciala uporabiti redoks elektrode (Jacob, 1970).

2.5.2.2 Merjenje redoks potenciala z elektrodami

Drugi način merjenja redoks potenciala je z elektrodami. Potencial elektrode, ki je rezultat oksidacije in redukcije, je meritev razlike med referenčno in meritveno elektrodo (Jacob, 1970). Izmerjeni potencial je definiran milivoltih (Jacob, 1970).

V laboratoriju in industrijskih bioreaktorjih se uporablajo sterilizabilne elektrode iz platine (indikatorska elektroda) in referenčne elektrode iz kalomela ali srebra/srebrovega klorida z 3 M KCl elektrolitom. Redoks elektrode so pod pritiskom in armirane. Pritisk preprečuje vstop brozgi v elektrolit preko kontaktne keramične površine (Berovič, 1987). Redoks potencial z elektrodami se določi glede na razliko med potencialom indikatorske elektrode, ki je v stiku z brozgo in potencialom referenčne elektrode. Referenčna elektroda ima konstanten potencial (kalomelova elektroda ima 244 mV), ki deluje kot inertni prenosnik elektronov in ne sodeluje v reakciji redoks sistema (Jacob, 1970).

Najbolje je, da se redoks potencial meri neprekinjeno med bioprosesom (Jacob, 1970). Saj je odvisen je od pH vrednosti, koncentracije raztopljenega kisika, ekilibriacijske konstante in oksido-reduksijskih potencialov v tekočini (Berovič, 1987).

2.5.3 Redoks potencial v biotehnologiji

V živih organizmih igrajo oksidacijsko reduksijski sistemi izredno pomembno vlogo. Redoks potencial v mikrobeni kulturi je seštevek vseh oksidacijsko reduksijskih procesov, kjer metabolismem v mikrobenih celicah igra najbolj pomembno vlogo (Berovič, 1987).

Variacije v redoks potencialu so lahko povzročene z metabolnimi produkti z redoks lastnostmi v raztopini ali z aktivnostjo različnih encimov (oksidaze, dehidrogenaze) v celici. Alternativno se lahko variacije redoks potenciala razloži s spremembami v tlaku kisika, ki nastane zaradi porabe kisika s strani mikroorganizmov in s spremembami v pH vrednosti, ki nastanejo zaradi metabolizma mikroorganizmov (Jacob, 1970).

Med procesom z regulacijo pH vrednosti, se lahko meri celoten redoks potencial (Kwong in sod., 1992). V inokuliranem gojišču sprememba potenciala v bolj negativne vrednosti kaže na začetek rasti. Meritve kisika ob istem času kažejo znižanje v procentu raztopljenega kisika. Hitrost in širina v katerem potencial postane bolj negativen je odvisno od hitrosti rasti in fiziološkega tipa bakterij. Proti koncu procesa potencial postane bolj pozitiven zaradi znižanja metabolizma in začetka lize celic (Jacob, 1970).

Meritve redoks potenciala ocenijo sposobnost življenja mikroorganizmov, njihovo rast kot tudi fiziološko aktivnost v definiranem okolju (Kukec in sod., 2002). Čeprav izmerjene vrednosti redoks potenciala v biopresesni brozgi odsevajo seštevek vseh redoks potencialov, njegove karakteristike ne morejo biti posplošene in tako je potrebno za vsak mikrobnii proces individualno preučiti vlogo redoks potenciala (Berovič in sod., 2000). Tengerdy (1961) je s primerjavo krivulj redoks potenciala razkril, da kažejo potrebo kulture po kisiku in da količina raztopljenega kisika direktno vpliva na respiracijo kulture, vendar ni nujno pomenila respiratorne neučinkovitosti. Pri aerobnih procesih so Kwong in sod. (1992) s pomočjo redoks potenciala in raztopljenega kisika lahko določili točke, kjer se začne rast celic in poraba substrata. Identificirali so metabolne spremembe, lag fazo, porabo treonina in glukoze med procesom. Redoks potencial lahko odseva tudi fiziološko stanje kulture. Lee in sod. (1998) so pri procesu produkcije L-ornitina z reguliranim pH in procentom raztopljenega kisika (OD2), lahko povezali časovne spremembe redoks potenciala s spremembami profila celic, porabo glukoze in produkcijo ornitina.

Redoks potencial se lahko uporabi tudi za spremeljanje produkcije, manipulacijo in optimizacijo procesa. Kwong in sod. (1991) so z uporabo minimalnega redoks potenciala kulture kot indikatorja preklopa metabolizma, povečali mešanje in dovod raztopljenega kisika med produkcijsko fazo, kar je zelo povečalo produkcijo aminokislin. Uporaba redoks potenciala za manipulacijo procesa se je izkazala za učinkovito tudi pri produkciji citronske kisline s plesnijo *Aspergillus niger* na pesni melasi kot gojišču (Berovič in sod., 2000).

Lin in sod. (2005) so redoks potencial uporabili kot indeks učinka oksidacijskega stanja na produkcijo klavulanske kisline in kot orodje za spremeljanje biosinteze sekundarnih metabolitov. Določili so preklop iz faze rasti v produkcijsko fazo v biosintezi klavulanske kisline pri bakteriji *S. clavuligerus*. Redoks potencial lahko priskrbi dodatne informacije o mikrobiaktivnosti kot parcialni tlak kisika in specifična poraba kisika ter pokaže, da ima nizko oksidacijsko stanje negativni efekt na biosintezo, kar povzroči zamik v produkciji klavulanske kisline.

3 MATERIALI IN METODE

Praktično delo v laboratoriju, ki je bilo izvedeno tekom magistrskega dela, lahko razdelimo na tri dele:

a) Optimizacija gojišč

Pri optimizaciji gojišč na nivoju stresalnika smo glede na zadovoljivo produkcijo eritromicina med obstoječimi gojišči izbrali najbolj primerna sporulacijskega, vegetativnega in produkcijskega gojišča. To kombinacijo gojišč smo nato uporabili v bioreaktorju pri proizvodnji eritromicina.

b) Optimizacija vodenja procesa proizvodnje eritromicina v bioreaktorju

Osrednji del magistrske naloge predstavlja vodenje bioprocesa za produkcijo eritromicina v laboratorijskih bioreaktorjih pri različnih pogojih bioprocesa, preučevali kako se sprememba bioprocесnih parametrov odraža na redoks potencialu in kako lahko le tega uporabimo kot vodilo za optimizacijo pri prenosu bioprocesa v večje merilo.

c) Analitski del

Laboratorijsko delo smo zaključili z določanjem koncentracije eritromicina iz biokulture in vsebnost le tega določili z mikrobiološkim testom, ko smo izvajali poskuse z naravnim sevom ter z HPLC metodo za visoko-produkcijski sev.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Uporabljene kemikalije

Spodaj naštete raztopine in reagente smo uporabljali v splošnih postopkih laboratorijskega dela:

- Etanol (JTBaker)
- HCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- 20 % glicerol (Merck)
- KCl (Merck)
- Na-hipoklorit (Mercator)

3.1.1.1 Delovni mikroorganizmi

Pri delu smo uporabljali naslednje mikroorganizme:

Preglednica 1: Uporabljeni mikroorganizmi pri delu v laboratoriju.

Vrsta	Tip	Vir
<i>Saccharopolyspora erythrea</i> WT	divji sev	NRRL23338
<i>Saccharopolyspora erythrea</i> ABE006	visoko-donosni sev	Acies Bio d.o.o.
<i>Bacillus subtilis</i>	WT119	Acies Bio d.o.o.

3.1.2 Uporabljena gojišča

Sestavine različnih gojišč, ki so navedene v preglednicah smo natehtali, dodali destilirano vodo do vnaprej določenega volumna in korigirali pH vrednost z 3M NaOH. Pri trdnih sporulacijskih gojiščih smo agar ločeno natehtali v steklenice, gojišče z uravnanim pH-jem pa ustrezno razdelili v steklenice (500 mL v 1-L steklenice ali 250 mL v 500 mL steklenice). Pri vegetativnih in produktivnih gojiščih smo razdelili gojišče po 5 mL v 50 mL falkonke.

3.1.2.1 Priprava sporulacijskih gojišč

Spodaj navedena sporulacijska gojišča smo uporabili za pripravo spor. Sporulacijska gojišča smo izbrali glede na to ali so omogočala sporulacijo obeh sevov aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea* (divjega tipa in industrijskega seva).

Sporulacijsko gojišče z ovseno moko

Sporulacijsko gojišče z ovseno moko smo za potrebe dela v laboratoriju poimenovali NERS-3.

Preglednica 2: Sestava sporulacijskega gojišča z ovseno moko (Shirling in Gottlieb, 1966; Hamedin sod., 2002, 2005, 2006; Rostamza in sod., 2008).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Ovsena moka	20	Cerestar
Tehnični agar	18	Biolife

* pH 7.2, sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa;

Sporulacijsko gojišče M1

Sporulacijsko gojišče M1 (Minas, 2005) smo za potrebe dela v laboratoriju poimenovali NERS-4.

Preglednica 3: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-4 (Minas, 2005).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Glukoza	5	Merck
Tripton	5	Fluka
Koruzni škrob	5	Cerestar
CSL (Koruzna namakalna vodica)	1	Cargill Foods
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2	Fluka
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,004	Fluka
CuSO ₄ 7H ₂ O	0,0008	Fluka
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,0002	Fluka
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,04	Fluka
CaCl ₂ 6H ₂ O	0,08	Fluka
NaCl	10	Merck
KH ₂ PO ₄	0,15	Merck
Tehnični agar	20	Biolife
dH ₂ O	Do 1L	

* pH 7, sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Sporulacijsko gojišče CM6

Preglednica 4: Sestava sporulacijskega gojišča CM6 (Kieser in sod., 2001).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Koruzni škrob	10	Cerestar
CSL (Koruzna namakalna vodica)	11	Cargill Foods
NH ₄ SO ₄	3	Merck
NaCl	3	Merck
CaCO ₃ (tehnični)	3	Kalcit
Tehnični agar	20	Biolife
dH ₂ O	do 1L	

* pH 7.2, sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Po uravnavanju pH na 7,2 se doda CaCO₃.

Sporulacijsko gojišče R2T20

Preglednica 5: Sestava sporulacijskega gojišča R2T20 (Aparicio in sod., 1996).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Saharoza	20	Merck
K ₂ SO ₄	0,25	Fluka
Kvasni ekstrakt	6,5	Sigma
Tripton	5	Fluka
Bakteriološki agar	22	Biolife
dH ₂ O	do 860 mL	
Po avtoklaviranju sterilno dodaj:	mL/1 L	
50 % glukoza	20	Merck
1M Tris pH7	25	
KH ₂ PO ₄ 0,5 %	5	Merck
1M NaOH	2,5	Merck
1M CaCl ₂	50	Fluka
1M MgCl ₂	50	Fluka
Elementi v sledovih	2	

* pH ni potrebno uravnati, sterilizacija traja 30 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Sporulacijsko gojišče PBG-L

Preglednica 6: Sestava sporulacijskega gojišča PBG-L (Sambrook in Russel, 2001).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Kvasni ekstrakt	20	Biolife
Laktoza monohidrat	20	Merck
Tehnični agar	20	Biolife
dH ₂ O	do 1L	
Po avtoklaviranju sterilno dodaj	uL/L	
Ca – pantotenat	400 uL	Merck

* pH 7.2 z NaOH, sterilizacija traja 45 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

3.1.2.2 Priprava vegetativnih gojišč

Pripravo vcepka smo testirali v različnih vegetativnih gojiščih. Vegetativna faza rasti aktinomicete *S. erythraea* je pomembna za pridobitev kakovostnega vcepka, ki je v fazi aktivne rasti.

Vegetativno gojišče V1

Vegetativno gojišče V1 (Minas, 2005) smo za potrebe dela v laboratoriju poimenovali NERV-4.

Preglednica 7: Sestava vegetativnega gojišča V1 (Minas, 2005).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Koruzni škrob	16	Cerestar
Dekstrin	10	Merck
Sojina moka	15	Cargill Foods
NaCl	2,5	Merck
CSL (Koruzna namakalna vodica)	5 mL/L	Cargill Foods
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	Merck
Sojino olje	6 mL/L	Tovarna olja GEA d.d.
CaCO_3	4	Kalcit

* pH 6,5, sterilizacija traja 40 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Vegetativno gojišče NERV-3

Preglednica 8: Sestava vegetativnega gojišča NERV-3 (Hamedi in sod., 2002, 2006).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Sojina moka	30	Cargill Foods
Glukoza	10	Merck
Glicerol	10	Merck
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1	Merck
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,5	Merck
CaCO_3	5	Kalcit

* pH 7, sterilizacija traja 40 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Vegetativno gojišče EVL

Preglednica 9: Sestava vegetativnega gojišča EVL (Kieser in sod., 2000).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
CSL (Koruzna namakalna vodica)	30	Cargill Foods
Saharoza	30	Mercator
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	Merck
CaCO_3	6	Kalcit

* pH 7, sterilizacija traja 40 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

3.1.2.3 Priprava produkcijskih gojišč

Sestava produkcijskega gojišča ima pomemben vpliv na produkcijo eritromicina oz. sekundarnih metabolitov, zato smo testirali različna produkcijska gojišča.

Produksijsko gojišče F1

Produksijsko gojišče F1 (Minas, 2005) smo za potrebe dela v laboratoriju poimenovali NERP-4.

Preglednica 10: Sestava produktivnega gojišča F1 (Minas, 2005).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Koruzni škrob	17,5	Cerestar
Dekstrin	16	Merck
Sojina moka	16,5	Cargill Foods
NaCl	3,5	Merck
CSL (Koruzna namakalna vodica)	10 mL/L	Cargill Foods
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	Merck
Sojino olje	3 mL/L	Tovarna olja GEA d.d.
CaCO_3	4	Kalcit

* pH 6.5, sterilizacija traja 40 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Produksijsko gojišče NERP-3

Preglednica 11: Sestava produktivnega gojišča NERP-3 (Hamedi in sod., 2002; Rostamza in sod., 2008).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Sojina moka	35	Cargill Foods
Dekstrin	70	Merck
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3	Merck
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	0,5	Merck
CaCO_3	12	Kalcit
Olje oljne ogrščice	7	Mercator

* pH 6.8, sterilizacija traja 40 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Produksijsko gojišče NERP-6

Preglednica 12: Sestava produktivnega gojišča NERP-6 (Hamedi in sod., 2005).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Glukoza	50	Merck
NaNO_3	18,5	Fluka
KH_2PO_4	3	Merck
K_2HPO_4	7	Fluka
Raztopina kovin v sledovih	2 mL	
dH_2O	do 1 l	

* pH 7 z 5M KOH, sterilizacija traja 40 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Preglednica 13: Sestava raztopine kovin v sledovih za produktivno gojišče NREP-6 (Hamedi in sod., 2005).

Raztopina kovin v sledovih	Koncentracija v raztopini (g/L)	Proizvajalec
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,25	Fluka
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,025	Fluka
CuCl ₂	0,0053	Fluka
CoCl ₂	0,00055	Fluka
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0138	Fluka
ZnCl ₂	0,0104	FLuka
MnCl ₂	0,0002	Fluka
Na ₂ MoO ₄	0,0003	Fluka

Produkcijsko gojišče EFL

Preglednica 14: Sestava produktivnega gojišča EFL (Kieser in sod., 2000).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Sojina moka	36	Cargill Foods
Koruzni škrob	36	Cerestar
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,4	Merck
CaCO ₃	7,2	Kalcit
Sojino olje	5	Merck

* pH 6,8, sterilizacija traja 40 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa.

3.1.2.4 Gojišče za biološki test

Gojišče Antibiotic Base Agar A2 (Biolife) je komercialno pripravljeno gojišče za določanje biološke aktivnosti, ki mu umerimo pH na 7,9. Tako pripravljeno gojišče segrevamo v vodni kopeli do 80°C ter ga nato razdelimo v steklenice. Gojišče se avtoklavira 15 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa.

Preglednica 15: Sestava trdnega gojišča ABA.

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
»Antibiotic base agar A2«	25,5	Biolife
dH ₂ O	do 1 L	

3.1.2.5 Gojišče za preverjanje čistosti bioprocesa 2TY

Trdno gojišče 2TY smo uporabili za preverjanje čistosti bioprocesa.

Preglednica 16: Sestava trdnega 2TY gojišča (Sambrook in Russel, 2001).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Kazein pepton	16	Biolife
Kvasni ekstrakt	10	Sigma
NaCl	5	Merck
Bateriološki agar	20	Biolife
dH ₂ O	do 1 L	

3.1.3 Uporabljene naprave

Pri laboratorijskem delu smo uporabljali aparature, ki so naštete v preglednici 19.

Preglednica 17: Seznam naprav.

Naprava	Proizvajalec
Analitska tehtnica	Sartorius
Avtomatske pipete	Gilson
Avtoklav	Laboklav
Bioreaktor z mešanjem	Applikon
Brezprašna komora	Telstar
Črpalka	Watson Marlow
Hladilnik (4°C)	LTH
HPLC aparatura	Thermo Finnigan Surveyor ⁺
Inkubator za streptomicete (30 °C)	Sutjeska
Inkubator za čistost vzorcev (37 °C)	Sutjeska
Magnetno mešalo	UniEquip
Mikroala centrifuga	Hattichlab
Merilec koncentracije glukoze	Bayer
Merilec koncentracije prostih amonijevih ionov	Macherey-Nagel
Mikrovalovna pečica	Sanyo
Mikroskop	Olympus
Palični mešalnik	Bosh
pH elektroda	Hamilton
pO ₂ elektroda	Hamilton
Redoks elektroda	Hamilton
Skrinja (-80°C)	HetoThermo
Spekrofotometer	Tecan
Stresalnik	HT Infors
Analitska Tehtnica ALT 220 – 4 NM	Kern
Laboratorijska tehtnica PLJ 2100	Kern
Velika centrifuga (4500 rpm)	Hattichlab
Vodna kopel	UniEquip
Vrtinčnik	IKA
Zamrzovalna omara (-20°C)	LTH

3.1.4 Ostali pribor in material

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali še:

3.1.4.1 Steklovina

- različne čaše
- 0,5 L steklenice z zamaškom
- 1 L steklenice z zamaškom
- 0,25 L Erlenmeyerjeve (EM) steklenice
- 1L EM steklenice
- homogenizatorje
- objektna in krovna stekelca

3.1.4.2 Ostali material in oprema

- luknjači za agar plošče
- različni merilni valji
- eppendorf kivete
- nastavki za avtomatske pipete
- pincete
- plinski gorilnik
- 50 mL falkon kivete (Falcon)
- 15 mL falkon kivete (Falcon)
- pasteurjeve pipete
- komplet za merjenje prostega amonijevega iona NH_4^+
- pikrotiterske plošče greiner
- petrijeve plošče
- zobotrebci
- plastične palčke za razmazovanje

3.2 METODE

3.2.1 Kultivacija streptomicete *Saccharopolyspora erythraea*

3.2.1.1 Sporulacijska faza

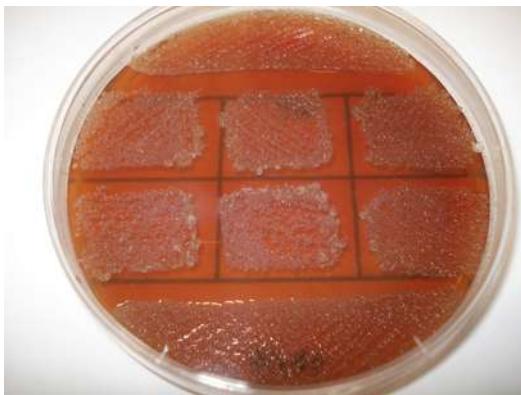
Sporulacijska faza služi za pripravo kvalitetnih spor testiranih sevov in njihovih posameznih kolonij. Ker različna gojišča omogočajo različno intenziteto sporulacije divjega tipa in visoko-donosnega seva *S. erythraea*, smo na vsako gojišče nanesli ustrezne decimalne redčitve (od 10^{-1} do 10^{-7}) (Madigan in sod., 2003).

Po 14 dneh inkubacije na 30°C smo ovrednotili intenziteto sporulacije po lestvici od 0 do 5, kjer 0 pomeni, da sporulacija ni vidna in 5, da je sporulacija zelo dobra.



Slika 7: Zadovoljiva intenzivnost sporulacije aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea*.

Gojišča, ki jih nismo uporabili v naslednjih fazah optimizacije gojišč, so navedena v prilogi A. Pogoj za izbiro sporulacijskih gojišč je bila zadovoljiva sporulacija enega izmed sevov aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea*.



Slika 8: Kultura aktinomicete *Saccaropolyspora erythraea*, kjer ni zadovoljive sporulacije.

3.2.1.2 Vegetativna faza

Vegetativna faza služi za pripravo vcepka sevov *S. erythraea* (divji tip in industrijski tip seva), ki smo ga uporabili za inokulacijo produksijskega gojišča. S to vmesno stopnjo želimo doseči intenzivno kalitev spor, tvorbo micelija ter pridobiti celice, ki so v logaritemski fazi rasti. Kakovosten vcepek je ključen za doseganje maksimalne produkcije eritromicina, ki ga lahko doseže posamezni sev. Spore smo pripravili iz različnih sporulacijskih gojišč iz katerih smo izbrali najboljše kolonije ter jih inokulirali v 50 mL falkon kivete s 5 mL določenega vegetativnega gojišča. Vegetativna faza traja 2 dni pri 30°C in hitrosti stresanja 220 rpm.

3.2.1.3 Producijnska faza

Pripravljen vcepek v različnih vegetativnih gojiščih smo uporabili za inokulacijo različnih produktivnih gojišč ter glede na najboljšo produkcijo eritromicina izbrali najbolj optimalno kombinacijo sporulacijskega, vegetativnega in produktivnega gojišča. Testiranje smo izvedli v 50 mL falkon kivetah, ki so vsebovale 5 mL posameznega producijnskega gojišča ter inokulirali z 10% vcepkom. Kultivacija v producijnski fazi je trajala od 5 do 9 dni (odvisno od posameznega produktivnega gojišča) pri 30°C in hitrosti stresanja 220 rpm.

3.2.2 Izvedba eksperimentov v laboratorijskih bioreaktorjih

V prvem delu naloge smo v manjšem merilu (falkon kivete) določili najboljšo kombinacijo sporulacijskega, vegetativnega in produktivnega gojišča za divji tip in industrijski tip seva aktinomicete *S. erythraea*, ki je omogočala najboljšo produkcijo glede na ostale kombinacije gojišč. Izbrano kombinacijo gojišč smo uporabili pri poskusih v laboratorijskem bioreaktorju s ciljem optimizacije vodenja bioprocesa, kjer smo uporabili naravni sev aktinomicete *S. erythraea* NRRL 23338.

3.2.2.1 Priprava vcepka

Za zadovoljivo produkcijo antibiotika v bioreaktorju je potrebno pripraviti kakovosten vcepek. Testirali smo produkcijo eritromicina z uporabo enostopenjske in dvostopenjske priprave vcepka. Pri pripravi enostopenjskega vcepka smo inokulirali spore divjega tipa seva aktinomicete *S. erythraea* v 1 L EM steklenico, ki vsebuje 400 mL EVL gojišča. Kulturo smo inkubirali 48 - 52 ur pri 30°C in 220 rpm. Pri pripravi dvostopenjskega vcepka smo s sporami inokulirali 250 mL erlenmajerice z 40 mL EVL gojišča (preglednica 11). Erlenmajerice smo stresali 24 ur pri 30°C in 220 rpm ter nato s 5% volumnom inokulirali 1 L EM steklenice z 400 mL EVL gojiščem. Erlenmajerice inkubiramo 48 ur pri enakih pogojih.

Pred inokulacijo pripravljenega vcepka v bioreaktor, smo preverili čistost in kakovost kulture, določili PMV in pH (glej: Meritve vzorcev tekom bioprocesa). Optimalen vcepek je imel vrednosti PMV 7–12 % ter pH 5,7–5,9. Če parametri niso bili doseženi, smo čas inkubacije podaljšali dokler se ni znižal pH ali dvignila PMV vrednost do zaželene vrednosti.

3.2.2.2 Priprava laboratorijskega bioreaktorja

Za poskuse optimizacije vodenja bioprocesa produkcije eritromicina smo uporabili mešalni bioreaktor podjetja Applikon (Nizozemska) z delovnim volumnom 4,8 L (Slika 9). Mešalni bioreaktor (Applikon) je sestavljen iz steklene posode in pokrova iz nerjavečega jekla,

grelnega plašča za vzdrževanje temperature in mešala tipa Rushtonova turbina (User manual).



Slika 9: Bioreaktor Applikon z delovnim volumnom 4,8 L.

Pred začetkom bioprocessa moramo bioreaktor pripraviti. Preverimo vse cevke za dohranjevanje, vcepek in izpuh, bioreaktor sestavimo in ga napolnimo z 3,5 L produktivnega gojišča EFL (Preglednica 16). Pred avtoklaviranjem tudi kalibriramo elektrodi za merjenje pH in redoks potencial. Redoks elektrodo kalibriramo na 220 mV, medtem ko pH elektrodo umerimo pri dveh vrednostih (pH 7 in pH 9). Kalibrirane elektrode privijemo v bioreaktor na za to določena mesta. Tako pripravljen bioreaktor steriliziramo 60 min pri 121°C in tlaku 120 kPa v avtoklavu (Laboklav). Po zaključeni sterilizaciji bioreaktor priključimo na kontrolno enoto Applikon in vključimo mešanje. Priključimo hladilno vodo, prepohovanje, temperaturni senzor, gredni plašč in elektrode. Ko se bioreaktor ohladi vključimo regulacijo temperature.

3.2.2.3 Vodenje bioprocessa

Bioprocес заčnemo z inokulacijo pripravljenega vcepka v EM steklenicah (glej: Priprava vcepka) z EVL gojiščem (Preglednica 11). Navadno so bili začetni parametri bioprocessa: temperatura 30°C, prezračevanje 2,5 L in mešanje 300 rpm.

Za optimizacijo procesa smo izvedli naslednje poskuse:

- določitev optimalnega načina priprave vcepka,
- vodenje procesa pri minimalnih pogojih oskrbe s kisikom (začetni pogoji, 350 rpm, 2,5 L/min),
- vodenje procesa pri maksimalnih pogojih oskrbe s kisikom (900 rpm, 6 L/min) in
- vodenje procesa s postopnim dvigovanjem procesnih parametrov (prezračevanje in mešanje) do maksimalnih pogojev in z dohranjevanjem substrata (35 h).

Bioprocес smo spremļjali z neprekinjenim merjenjem temperature, vrednosti pH, vrednosti DO (parcialni tlak raztopljenega kisika) in vrednostmi redoks potenciala. Dodatno se proces spremļja tudi z vzorčenjem, pri katerem smo vzorcem izmerili PMV (parcialni volumen micelija), pH vrednost, koncentracijo prostih amonijevih ionov in koncentracijo glukoze. Tekom bioprocesa se spremļja tudi čistost bioprocesa (prisotnost morebitnih okužb) z nacepljanjem vzorčene brozge na trdno gojišče 2TY in CM6.

3.2.2.4 Meritve vzorcev tekom bioprocesa

Za uspešno vodenje bioprocesa si poleg neposrednih (angl. »on line«) meritiv pH, redoks potencial in procenta raztopljenega kisika, pomagamo še posameznimi analizami v laboratoriju (angl. »off line«) analizami:

- vsebnost eritromicina
- čistost in morfologija proizvodne kulture (mikroskopski pregled)
- vrednost PMV
- koncentracija glukoze
- koncentracija prostih amonijevih ionov
- mikroskopski preparat

Analize v laboratoriju smo določali z aseptičnim vzorčenjem bioprocесne brozge. Najprej smo del vzorca nacepili na trdna gojišča za spremļjanje čistosti kulture v bioreaktorju. Vzorcu smo pomerili pH vrednosti z zunanjim pH metrom ter s tem preverili pravilnost neposredne meritve pH vrednosti v bioreaktorju. Prav tako smo določili vrednost PMV po 10 minutah centrifugiranja pri 3000 rpm. Supernatant vzorca smo uporabili za meritve koncentracije glukoze in prostih amonijevih ionov. Za merjenje koncentracije glukoze smo uporabili merilni komplet (Contour, Bayer), koncentracijo amonijevih ionov pa smo določili s kitom (Quantofix Ammonium, Macherey-Nagel) po navodilih proizvajalca. Del vzorca smo uporabili za določanje koncentracije eritromicina, kar nam je omogočilo spremļjanje produkcije eritromicina tekom bioprocesa.

Pripravili smo tudi mikroskopski preparat s katerim smo spremļjali spremembe v morfologiji aktinomicete *S. erythraea* med potekom bioprocesa.

3.2.3 Določanje vsebnosti eritromicina

3.2.3.1 Ekstrakcija eritromicina

Koncentracija proizvedenega eritromicina v divjem in industrijskem tipu seva *S. erythaea* se zalo razlikuje. Industrijski sev proizvaja bistveno večje koncentracije eritromicina, zato je najlažje izmeriti vsebnost eritromicina z uporabo HPLC metode. V nasprotju, pa divji tip seva proizvaja tako nizke koncentracije antibiotika, da ni mogoče natančno pomeriti s HPLC metodo, temveč jih lahko pomerimo z mikrobiološkim testom uporabe testnega mikroorganizma. Zaradi različnih metod merjenja se tudi protokola za ekstrakcijo eritromicina iz kulture za oba seva razlikujeta.

Pri ekstrakciji eritromicina iz brozge pridobljene z industrijskem sevom aktinomicete *S. erythraea* ABE006 smo najprej korigirali pH vrednost na območje 9,5 – 10 z uporabo NaOH, nato smo dodali acetonitril v razmerju 1:1 in dobro homogenizirali. Po 40 minutah stresanja na stresalniku pri 220 obr./min, smo ekstrakcijski brozgi dodali 1 g soli ter zopet stresali 20 minut pri istih pogojih. Temu je sledilo centrifugiranje pri 4500 obr./min 3 minute, kjer smo lahko opazili ločeni fazi. Zgornjo organsko fazo ekstrakta, kjer se nahaja eritromicin, smo prenesli v eppendorf kivete, jih centrifugirali pri 14000 obr./min 10 minut in del supernatanta prenesli v viale za HPLC analizo. Pri divjem tipu seva *S. erythraea* smo ekstrakcijo začeli brez korekcije pH vrednosti in direktno na brozgo smo dodali acetonitril v razmerju 1:1. Po 60 minutah stresanja na stresalniku pri 220 obr./min smo falkon kivete centrifugirali 3 minute pri 4500 obr./min. Supernatant smo prenesli v epice in jih ponovno centrifugirali 10 minut pri 14000 obr./min. Na tako pripravljenih vzorcih smo določili koncentracijo eritromicina z biološkim testom.

3.2.3.2 Izvedba biološkega testa

Mikrobiološki test uporabljamo pri vzorcih divjega tipa seva aktinomicete *S. erythraea*, ki proizvaja nizke koncentracije eritromicina.

Približno 12 ur pred izvedbo biološkega testa smo EM steklenico z 50 mL gojišča 2TY inokulirali s testnim mikroorganizmom *Bacillus subtilis* WT119 in inkubirali pri 30°C in 220 obr./min. Prekonočno kulturo testnega organizma smo prelili v falkon kiveto in centrifugirali 10 minut pri 4500 obr./min. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in resuspendirali celice v 25 mL 2TY gojišča. Vnaprej pripravljeno ABA gojišče smo ohladili na 50°C in mu dodali pripravljeno kulturo testnega organizma (v 500 mL ABA gojišča smo dodali 10 mL kulture testnega organizma), dobro premešali in razlili petrijeve plošče (25 mL na ploščo). Tako pripravljene plošče smo inkubirali 2 uri na 4°C. Sledi priprava ustreznih redčitev (10- in 20-kratna redčitev) ekstrahiranih vzorcev v acetonitrilu in priprava strandarnih raztopin eritromicina (koncentracije 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 in 25 µg/mL). Po 2 urah smo naredili v ploščah luknjice in nanesemo 60 µL redčenega vzorca in

standarda na luknjico. Po nanosu smo inkubirali plošče v hladilniku 2 uri, da naneseni vzorci in standardi difundirajo v gojišče. Po 2 urah smo plošče prenesli v inkubator na 37°C ter smo jih inkubirali približno 18 ur oziroma toliko časa, da se pojavi dobro vidne cone inhibicije rasti testnega mikroorganizma. Nato izmerimo premer con na 0,5 mm natančno. Iz dobljene vrednosti standardov smo naredili umeritveno krivuljo ter preračunali koncentracijo eritromicina v vzorcih.

3.2.3.3 HPLC analiza

Vsebnost eritromicina pri visoko-donosnem sevu aktinomicete smo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti – HPLC.

Pri HPLC analizah smo uporabljali aparat proizvajalca Thermo Finnigan Surveyor⁺, ki ga sestavljača črpalka, avtomatski vzorčevalnik, detektor in osebni računalnik s programom za zajem podatkov. Uporabili smo kolono Thermo Hypersil Gold. Mobilna faza je bila sestavljena iz 10 mM amonijevega acetata (pH nastavljen na 9,8 z razredčeno amonijevo raztopino) in acetonitrila. Pretok v HPLC sistemu je 0,8 mL/min, medtem ko je temperatura kolone 40 °C. Valovna dolžina detekcije eritromicina je bila 206 nm (Kirm, 2014).

3.2.4 Statistična analiza pridobljenih podatkov

Pridobljene rezultate smo statistično obdelali, kar nam je omogočilo lažjo interpretacijo rezultatov. Tako smo najprej izračunali povprečje, ki je definirano kot kvocient vsote in številom vseh meritev.

Formula za izračun povprečja (Košmelj, 2001):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (10)$$

Nato smo izračunali še standardni odklon, ki poda povprečno odstopanje od povprečne vrednosti.

Formula za izračun standardnega odklona (Košmelj, 2001):

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \dots (11)$$

4 REZULTATI

Cilj magistrskega dela je bil optimizacija biosinteznega procesa za produkcijo eritromicina z optimizacijo gojišč in pogojev gojenja v laboratorijskem merilu. Osredotočili smo se na sledenje redoks potenciala v času biosinteze eritromicina in ugotovili, da je redoks potencial dobro orodje, ki omogoča boljše razumevanje bioprocessa, saj lahko lažje določimo optimalne pogoje gojenja v bioreaktorju. Tako pridobljeni podatki za redoks potencial lahko pomagajo pri prenosu bioprocessa in izboljšanju produkcije eritromicina v večjem merilu.

4.1 REZULTATI OPTIMIZACIJE GOJIŠČ

4.1.1 Optimizacija sporulacijskih gojišč

Na začetku projekta smo preučili vpliv različnih sporulacijskih gojišč na intenziteto sporulacije, saj so kakovostne spore zelo pomembne za pripravo dobrega vcepka ter posledično optimalno produkcijo eritromicina tako v manjšem merilu (falkonke), kot tudi v bioreaktorjih. Za eksperimente smo uporabili dva seva *Saccharopolyspora erythrea* in sicer naravni sev (divji tip - wt) in visoko-donosni industrijski sev ABE006.

Testirali smo večje število sporulacijskih gojišč, vendar smo za nadaljnje poskuse uporabili gojišča, ki so omogočala rast divjega tipa in industrijskega seva aktinomicete *S. erythraea*. Ostala testirana gojišča, ki niso bila uporabljena v nadalnjih poskusih, so našteta v prilogah.

Sporulacija sevov *Saccharopolyspora erythrea* smo ocenjevali po naslednji lestvici:

- 0 – ni sporulacije
- 1 – malo sporulacije
- 2 – bolje opazna sporulacija
- 3 – dobra sporulacija
- 4 – boljša sporulacija
- 5 – najboljša sporulacija

Preglednica 18: Rezultati preizkušanja različnih sporulacijskih gojišč pri naravnem in industrijskem sevu aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea*.

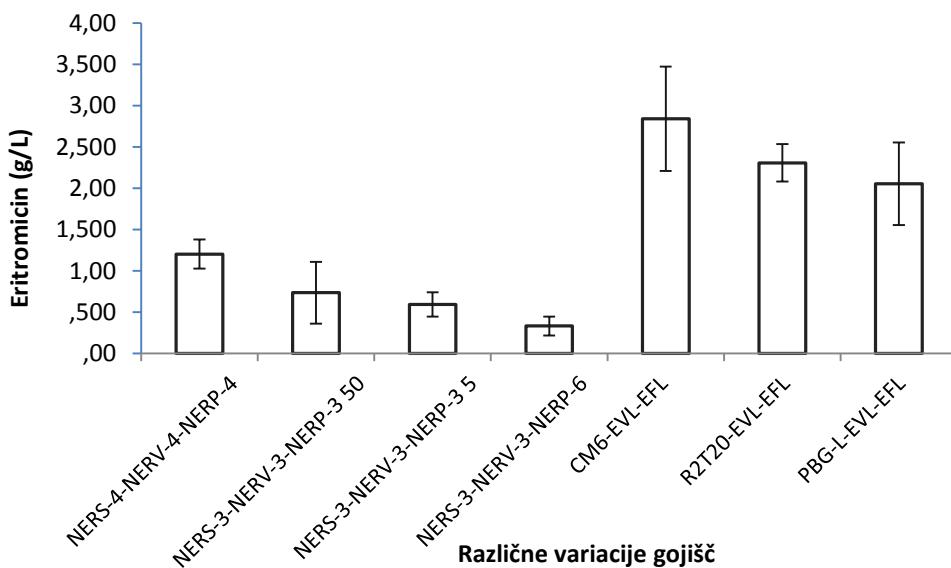
Sev WT	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>					<i>Saccharopolyspora erythraea ABE006</i>					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Gojišče / Redčitev	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
R2T20	5	5	5	5	5	3	4	4	4	4	4
CM6	0	0	0	0	1	5	5	5	5	5	5
SM MgCl ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NERS-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NERS-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NERS-3	1	1	1	1	0	3	3	4	3	3	3
NERS-4	1	2	3	5	5	5	5	4	4	4	4
NERS-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NERS-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBGL	0	0	1	0	1	2	2	2	2	3	3

Iz preglednice 20 je razvidno, da so različna trdna gojišča omogočila različno stopnjo sporulacije tako pri divjem tipu seva, kot tudi pri industrijskem sevu aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea ABE006*. Pri divjem tipu aktinomicete *S. erythraea* je gojišče R2T20 omogočilo najboljšo sporulacijo, medtem ko pri kultivaciji na gojiščih SM, NERS-1, NERS-2, NERS-5 in NERS-6 nismo opazili sporulacije. Pri industrijskem sevu *S. erythraea ABE006* smo opazili najboljšo sporulacijo na gojišču CM6, medtem ko smo pri kultivaciji na gojiščih SM, NERS-1, NERS-2, NERS-5 in NERS-6 opazili le substratni micelij.

4.1.2 Optimizacija vegetativnih in produktivnih gojišč

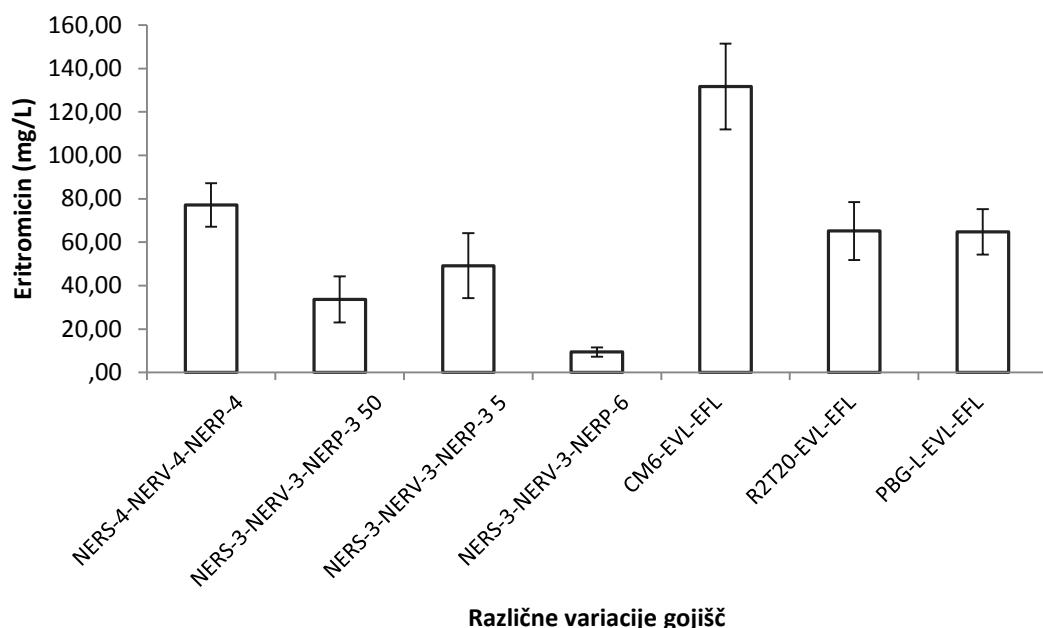
Pri izboru oziroma optimizaciji vegetativnih in produktivnih gojišč smo uporabili sporulacijska gojišča pri katerih smo opazili zadostno sporulacijo pri obeh uporabljenih sevih aktinomicete *S. erythraea*. Tako smo za oba seva *S. erythraea* izbrali za testiranje naslednja sporulacijska gojišča: R2T20, CM6, NERS-3, NERS-4 in PBGL v kombinaciji z vegetativnim EVL in produktivnim EFL gojiščem. Medtem ko sta bila sporulacijska gojišča NERS-3 (Romstamza in sod. (2008)) in NERS-4 (Minas, 2005) testirana v kombinaciji z v literaturi opisanim vegetativnim NERV-3 in NERV-4 ter produkcijskimi NERP 3-6 gojišči (Slika 10). Tako smo pri obeh sevih *S. erythraea* smo testirali 7 kombinacij sporulacijskih, vegetativnih in produktivnih gojišč in na ta način žeeli optimizirali donos proizvedenega eritromicina v produkcijski fazni.

Na sliki 10 so predstavljeni podatki treh neodvisnih poskusov na nivoju stresalnika v katerem je bil vsak sev pripravljen v dveh paralelkah za vsako izmed uporabljenih kombinacij gojišč.



Slika 10: Rezultati produkcije eritromicina pri industrijskem sevu ABE006 aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea* na različnih sporulacijskih, vegetativnih in produktivnih gojišč (na osi x so označena v vrstnem redu -sporulacijsko-vegetativno-produktivno gojišče).

Na sliki 10 je prikazan končni donos (po 7 dnevih kultivacije) eritromicina z uporabo različnih kombinacij sporulacijskih, vegetativnih in produktivnih gojišč pri industrijskem sevu aktinomicete *S. erythraea* ABE006. Najboljša kombinacija za produkcijo eritromicina je bila sporulacijsko gojišče CM6, vegetativno EVL in produktivno EFL gojišče saj je bil končni donos eritromicina najvišji (2,3 - 3,5 g/L). Kombinacija vegetativnega gojišča EVL in produkcijskega EFL je bila najboljša, saj je dajala najvišje donose eritromicina v primerjavi z ostalimi kombinacijami gojišč (NERS-4-NERV-4-NERP-4, NERS-3-NERV-3-NERP-3₅₀, NERS-3-NERV-3-NERP-3₅, NERS-3-NERV-3-NERP-6, R2T20-EVL-EFL IN PBGL-EVL-EFL). Gojišče EVL je tako omogočilo razvoj dobrega vcepka za produktivno gojišče, kar je posledično omogočilo boljšo produkcijo eritromicina, kljub slabši rasti industrijskega seva na sporulacijskih gojiščih PBGL in R2T20.



Slika 11: Rezultati produkcije eritromicina pri divjem tipu seva *Saccharopolyspora erythraea* na različnih sporulacijskih, vegetativnih in produktivnih gojišč (na osi x so označena v vrstnem redu -sporulacijsko-vegetativno-produktivno gojišče).

Podobno kot pri industrijskem sevu smo tudi pri divjem tipu najboljšo produkcijo eritromicina dosegli s kultivacijo na sporulacijskem gojiščem CM6, vegetativnem EVL in produktivnem gojiščem EFL. Končni donos eritromicina se je gibal v razponu med 110 in 150 mg/L (Slika 11). Tudi pri tem sevu je bila kombinacija vegetativnega gojišča EVL in produksijskega EFL najboljša in je omogočala najvišje donose eritromicina.

Na podlagi pridobljenih rezultatov donosa eritromicina na stresniku, smo izbrali sporulacijsko gojišče CM6, vegetativno EVL in produktivno EFL gojišče za nadaljnjo izvedbo eksperimentov v laboratorijskem bioreaktorju.

4.2 OPTIMIZACIJA BIOPROCESA ZA PRODUKCIJO ERITROMICINA V LABORATORIJSKEM BIOREAKTORJU

V drugi fazi raziskovalnega dela smo uporabili rezultate iz prvega dela magistrske naloge v laboratorijskem okolju z naravnim sevom *S. erythraea* WT. Uporabili smo kombinacijo sporulacijskega, vegetativnega ter produktivnega gojišča (CM6, EVL in EFL) za nadaljnjo optimizacijo vodenja bioprocesa v bioreaktorju. Pri vseh eksperimentih v bioreaktorju smo tako za pripravo spor uporabljali sporulacijsko gojišče CM6. Priprava vcepka je potekala v Erlenmeyerevih (EM) steklenicah z vegetativnim gojiščem EVL, katerega smo uporabili za inokulacijo bioreaktorja s produktivnim gojiščem EFL.

Vsi eksperimenti so bili izvedeni v najmanj dveh neodvisnih ponovitvah in za lažjo interpretacijo smo izbrali posamezen eksperiment za določen testiran parameter. Pri

posameznem eksperimentu pride do odstopanja merjenih bioprosesnih parametrov (spreminjanje vrednosti pH, DO₂, redoks potenciala, koncentracije glukoze, koncentracije prostih amonijevih ionov in koncentracije eritromicina) zaradi biološke variabilnosti, saj kažejo sevi vedno določene razlike pri rasti, morfologijo, porabi substratov in produkciji.

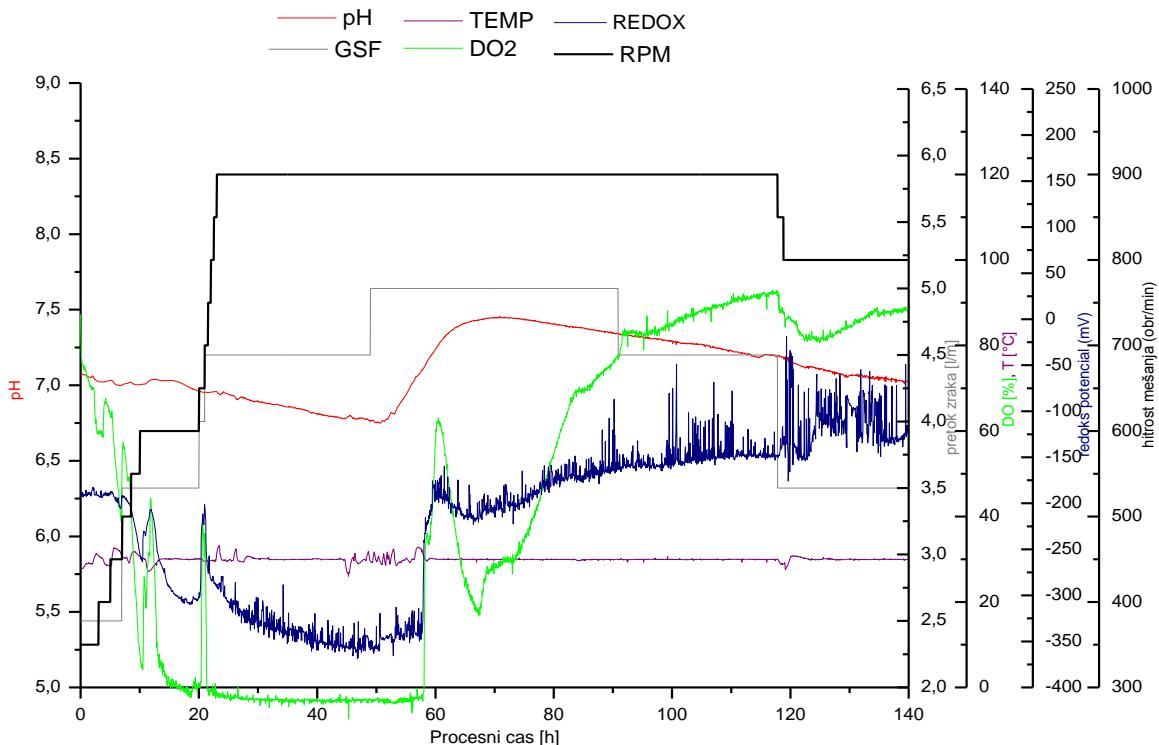
V bioreaktorskem merilu smo izvedli naslednje poskuse:

- testiranje enostopenjske in dvostopenjske priprave vcepka,
- testiranje vpliva različne oskrbe s kisikom na produkcijo eritromicina, kjer smo testirali:
 - vodenje procesa pri hitrosti mešanja 350 rpm in pretoku zraka 2,5 l/min (limitacija pri oskrbi s kisikom)
 - vodenje procesa pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretoku zraka 6 l/min (maksimalno prezračevanje) in
- testiranje vpliva dohranjevanja z glukozo na produkcijo eritromicina, kjer smo vodili proces s postopnim dvigovanjem števila obratov mešanja in pretoka zraka ter z enkratnim dodatkom glukoze pri 35 h bioprosesa.

4.2.1 Testiranje priprave vcepka

Na začetku dela na bioreaktorskem merilu smo testirali dva različna načina priprave vcepka in določili kateri način priprave vcepka je omogočil najboljši končni donos eritromicina v laboratorijskem bioreaktorju. Testirali smo enostopenjski in dvostopenjski način priprave vcepka. V prvem primeru smo v 2-L EM steklenice z EVL gojiščem (Preglednica 9) inokulirali spore shranjene na -80°C in inkubirali 48 - 52 ur. Pri dvostopenjskem načinu priprave vcepka pa smo spore inokulirali v 250-ml EM steklenice in po 24 urah 5 vol.% kulture uporabili za inokulacijo 2-L EM steklenice z vegetativnim gojiščem EVL ter inkubirali 48 ur. Pripravljen enostopenjski in dvostopenjski vcepek smo uporabili za inokulacijo bioreaktorja.

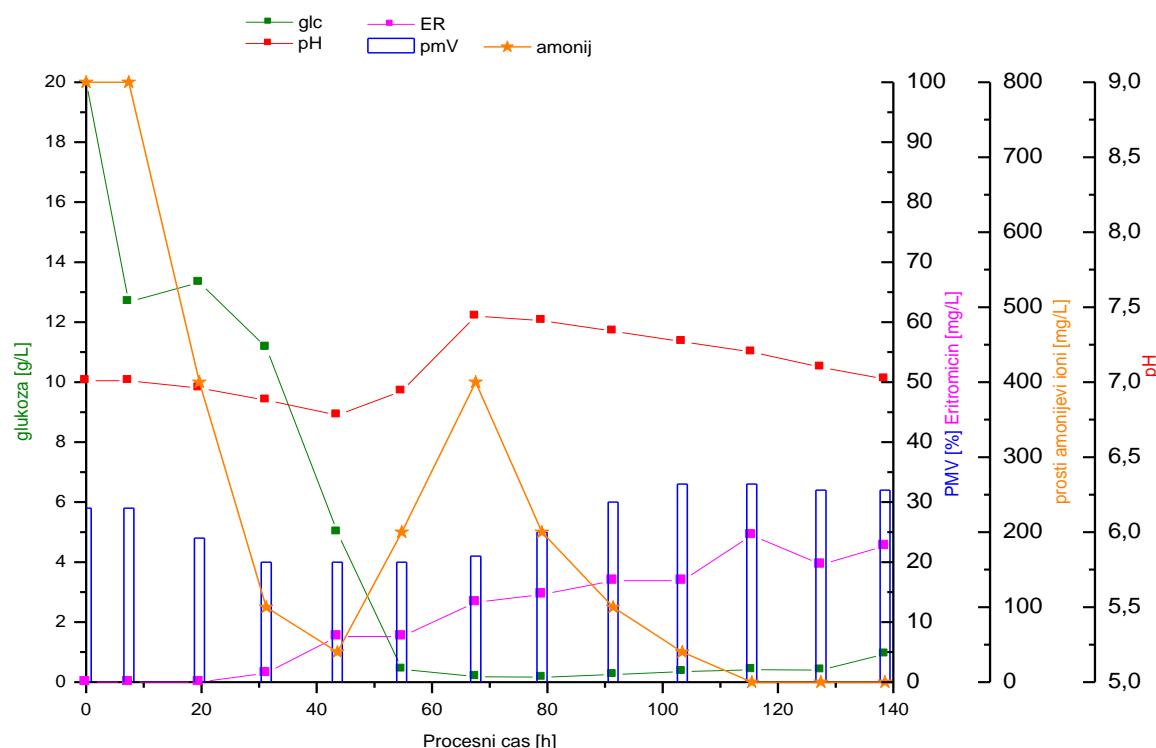
4.2.1.1 Dvostopenjska priprava vcepka



Slika 12: Časovni potek bioprocesa z dvostopenjskim vcepkom ter postopnim dvigovanjem obratov in pretoka zraka, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotka raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja (Legenda: pH-pH vrednost, GSF-pretok zraka (l/min), TEMP-temperatura (°C), DO2-odstotek raztopljenega kisika (%), REDOX-redoks potencial (mV), RPM-hitrost mešanja (obr/min)).

Na sliki 12 je prikazan potek bioprocesa z dvostopenjskim vcepkom, kjer so se neprekinjeno spremajale vrednosti pH, temperature, odstotek raztopljenega kisika (DO₂), redoks potenciala, pretoka zraka in hitrosti mešanja. Bioprocес z dvostopenjskim vcepkom smo začeli pri hitrosti mešanja 350 rpm, pretokom zraka 2,5 l/min in temperaturi 30 °C. Temperaturo smo vzdrževali konstantno tekom bioprocesa, medtem ko smo pretok zraka in obrate mešanja postopno dvigovali do 24. ure bioprocesa glede na DO₂. Želeli smo zagotoviti zadostno oskrbo kulture s kisikom. Minimalna vrednost DO₂ v laboratorijskih bioreaktorjih je bila nastavljena na 30 %, vendar to vrednost med 10. in 60. uro bioprocesa nismo uspeli zagotoviti, saj je DO₂ padel na 0 % (poraba raztopljenega kisika je bila večja, kot dovajanje kisika v bioreaktor) (Slika 12). Po 60. uri procesa pa se je vrednost DO₂ višala do konca bioprocesa. Vrednosti redoks potenciala je tekom bioprocesa sovpadala s trendom spremenjanja DO₂. V prvih 60. urah bioprocesa je vrednost redoks potenciala padala, nato pa naraščale do konca bioprocesa. V času od 40. do 55. ure bioprocesa je prišlo do največje limitacije s kisikom saj je v tem času vrednost redoks potenciala padla na minimum (-350 mV), medtem ko je bila vrednost DO₂ 0% od 24. do 60. ure bioprocesa. Ob 12., 25. in 60. urah bioprocesa smo opazili, da sta vrednost redoks potenciala in DO₂ na kratko poskočila. Na sliki 12 lahko tudi vidimo, da so se vrednosti DO₂ zvišale v

primerjavi z vrednostmi redoks potenciala kar lahko pojasnimo s tem, da je bila verjetno elektroda za merjenje DO_2 bolj odzivna v primerjavi z elektrodo za merjenje redoks potenciala. Vrednost pH se je tekom bioprocasa tudi spremenjala, saj med bioprocесом nismo regulirali pH vrednosti. Po sterilizaciji bioreaktorja je bila pH vrednost gojišča 7,2, nato se je pH vrednost do 50. ure bioprocasa počasi nižala do 6,8. Po 50. h bioprocasa je pH vrednost dokaj hitro naraščala do maksimuma 7,4 ter se nato počasi nižala do konca bioprocasa. Dvig pH vrednosti v 60. uri bioprocasa je sovpadala z dvigom vrednosti redoks potenciala in DO_2 . Vendar dvig pH vrednosti ni bil tako izrazit, kot dvig vrednosti redoks potenciala in DO_2 . Da je v 60. uri bioprocasa začela naraščati vrednost pH, lahko razložimo kot posledico izrabe primarnega vira ogljika (glukoza, glej sliko 13) in je dvig pH vrednosti posledica porabe aminokislin kot vir ogljika. Pri porabi aminokislin se sprošča amonijev ion, ki povzroči dvig vrednosti pH. Ker sta se v 60. uri bioprocasa vrednosti redoks potenciala in vrednosti DO_2 (Slika 12) tudi dvignile, je najverjetneje v tem času prišlo do preklopa v metabolizmu kulture, kot posledica izrabe glukoze in aktivne asimilacije aminokislin.



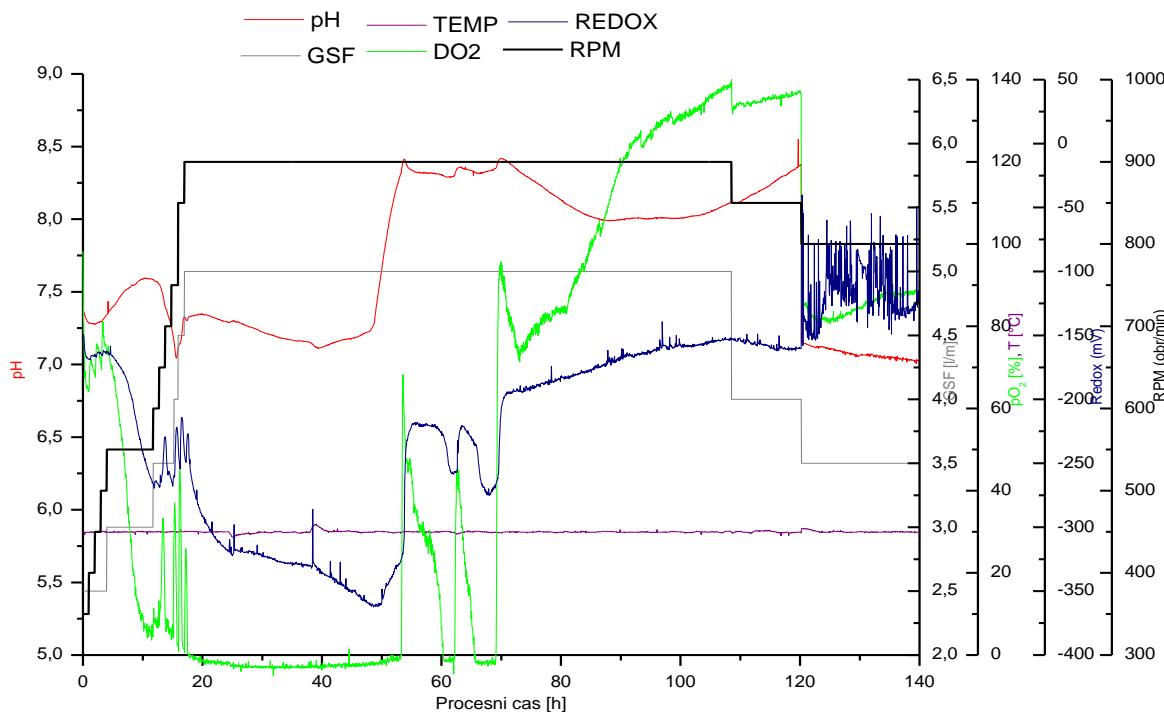
Slika 13: Časovni potek bioprocasa z dvostopenjskim vcepkom ter postopnim dvigovanjem obratov in pretoka zraka, ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, vrednosti PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov (Legenda: glc-koncentracija glukoze (g/L), pH-pH vrednost, ER-koncentracija eritromicina (mg/L), PMV-zbiti micelični volumen (%), amonij-koncentracija prostih amonijevih ionov (mg/L)).

Tekom bioprocasa z dvostopenjskim vcepkom in postopnim dvigovanjem obratov smo tudi odvzemali vzorce in tako dobili točkovne meritve vrednosti pH in PMV ter koncentracije glukoze, eritromicina in prostih amonijevih ionov (Slika 13). Vrednost PMV (parcialni

volumen micelija) je poenostavljena ocena tvorbe in morfološkega stanja biomase. Iz slike 13 lahko razberemo, da je na začetku procesa PMV 30 % (vrednost je visoka zaradi netopnih substratov prisotnih v produkcijskem gojišču), ki je nato z njihovo razgradnjo med 30. in 55. uro padel na 20 %. Po 20. uri bioprocesa se je vrednost DO₂ z rastjo biomase postopno dvigovala do 105. ure, kjer je vrednost PMV dosegla najvišji odstotek (32%) (Slika 12). Začetna koncentracija glukoze v produkcijskem gojišču je bila 20 g/L. Iz slike 13 je razvidno, da je koncentracija glukoze takoj na začetku bioprocesa hitro padala. Glukoza je bila porabljena pri 50. uri bioprocesa. Koncentracija prostih amonijevih ionov je bila na začetku bioprocesa 800 mg/L in je v 45. urah padla na 50 mg/L. Vendar, med 45. in 100. uro bioprocesa pa je koncentracija prostih amonijevih ionov narastla do 400 mg/L (70. ura bioprocesa, slika 13) ter nato padla do 0 mg/L pri 115. uri bioprocesa. Ta skok koncentracije prostih amonijevih ionov lahko razložimo s porabo sojine moke v gojišču, ki služi kot vir ogljika. Razgradnja sojine moke (sojina moka je bogat vir proteinov) s strani kulture, je povzročila dvig koncentracije prostih amonijevih ionov. V obdobju med 45. in 70. uro bioprocesa je verjetno prišlo do hidrolize proteinov soje, deaminacije različnih aminokislin in sproščanja prostih amonijevih ionov v gojišče, kar se tudi ujema z najvišjo izmerjeno pH vrednostjo (7,4) (Slika 12 in 13). Gibanje vrednosti pH se je preko celotnega bioprocesa ujemala s trendom koncentracije prostih amonijevih ionov. Gibanje pH vrednosti na sliki 12 se ujema s trendom pH vrednosti na sliki 13.

Eritromicin (ER) se začne proizvajati pri 30. uri bioprocesa, koncentracija ER je skozi proces konstantno naraščala do vrednosti 23 mg/L na koncu bioprocesa. Največja specifična hitrost produkcije je bila dosežena med 54. in 115. uro in je znašala 0,27 mg/l/h.

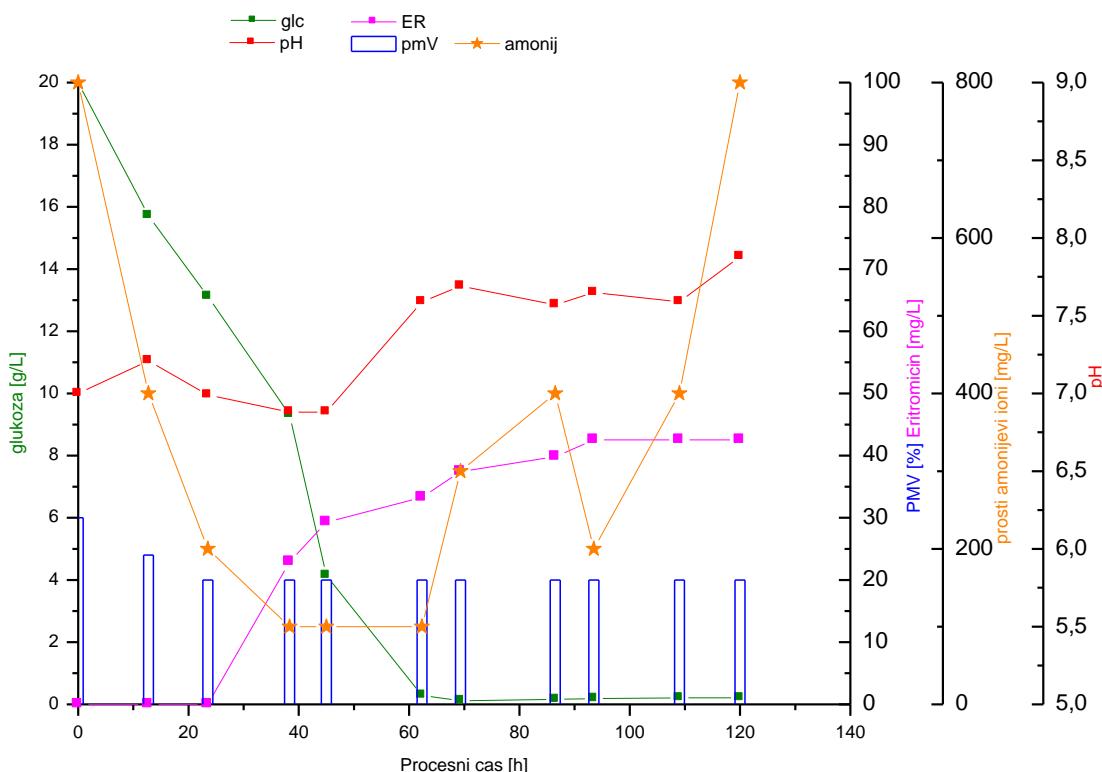
4.2.1.2 Enostopenjska priprava vcepka



Slika 14: Časovni potek bioprocesa z enostopenjskim vcepkom ter postopnim dvigovanjem obratov in pretokom zraka, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotek raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja (Legenda: pH-pH vrednost, GSF-pretok zraka (l/min), TEMP-temperatura (°C), DO2-odstotek raztopljenega kisika (%), REDOX-redoks potencial (mV), RPM-hitrost mešanja (obr/min)).

Podobno kot pri biopresusu z dvostopenjskim vcepkom, smo tudi pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom postopno dvigovali obrate in pretok zraka ter neprekinjeno spremljali vrednost pH, temperaturo, odstotek raztopljenega kisika, redoks potenciala, pretoka zraka in hitrosti mešanja (Slika 14). Do 20. ure biopresusa smo dvigovali hitrost mešanja in pretok zraka glede na spremjanje vrednosti DO₂. Tudi v začetnih 70. urah pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom nismo uspeli vzdrževati vsaj minimalno vrednost DO₂, ki je bila nastavljena na 30%, saj je vrednost DO₂ v tem obdobju padla na 0 %. Po 70. uri se je DO₂ višala do konca biopresusa. Med 40. in 55. uro biopresusa je prišlo do maksimalne limitacije s kisikom, saj je v tem času vrednost redoks potenciala padla na minimum, medtem ko je bila vrednost DO₂ na 0 % (poraba raztopljenega kisika je bila večja, kot dovanjanje kisika v bioreaktor) od 18. ure biopresusa. Naslednja podobnost z biopresesom z dvostopenjskim vcepkom (Slika 12) je tudi v sovpadanju trenda vrednosti redoks potenciala in DO₂. Pri 12., 53., 63. in 70. urah biopresusa so se vrednosti redoks potenciala in DO₂ hitro dvignile. Vrednost pH se je tekom biopresusa z enostopenjskim vcepkom spremnjala (Slika 14), saj med biopresesom nismo regulirali pH vrednosti. Po sterilizaciji je bila vrednost pH 7,2, ki je v prvih 10. urah biopresusa narastla na 7,6, nato pa je začela padati do 40. ure biopresusa. Pri 18. urah biopresusa se je vrednost pH hitro znižala na vrednost 7,0. Po 50. urah biopresusa je pH vrednost hitro naraščala do

maksimalne vrednosti 8,4 in se je z manjšimi spremembami nahajala blizu te točke do konca bioprosesa. Dvig pH vrednosti v 50. uri bioprosesa je sovpadala z dvigom redoks potenciala in DO_2 , vendar dvig ni bil tako izrazit (Slika 14). V 50. uri bioprosesa smo predvidevali, da pride do metabolnega preklopa kulture, saj je bila do tega časa porabljen glukoza (Slika 15). Poraba glukoze je v tej točki bioprosesa povzročila dvig vrednosti redoks potenciala, DO_2 in vrednosti pH.



Slika 15: Časovni potek bioprosesa z enostopenjskim vcepkom ter postopnim dvigovanjem obratov in pretoka zraka, ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju; vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, vrednosti PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov (Legenda: glc-koncentracija glukoze (g/L), pH-pH vrednost, ER-koncentracija eritromicina (mg/L), PMV-zbiti micelični volumen (%), amonij-koncentracija prostih amonijevih ionov (mg/L)).

Tekom bioprosesa z enostopenjskim vcepkom in postopnim dvigovanjem obratov smo odvzemali vzorce bioprosesne brozge in izvedli analize v laboratoriju. Z analizami v laboratoriju smo pridobili vrednosti pH in PMV ter koncentracije glukoze, eritromicina in prostih amonijevih ionov (Slika 15). Na začetku bioprosesa je bila vrednost PMV 30 % in je padla v 24 urah na 20 %, in se nato z manjšimi spremembami nahajala blizu te točke do konca bioprosesa. Tako kot pri bioprosesu z dvostopenjskim vcepkom (Slika 13), je tudi pri bioprosesu z enostopenjskim vcepkom koncentracija glukoze z začetne vrednosti 20 g/L v 62. urah padla na 0 g/L. Koncentracija prostih amonijevih ionov je bila na začetku bioprosesa 800 mg/L in je hitro padla do 100 mg/L pri 38. urah procesa ter se ni spremenjala do 62. ure bioprosesa. Med 65. in 85. uro bioprosesa se je koncentracija prostih amonijevih ionov zvišala do 400 mg/L ter pri 92. uri padla na vrednost 200 mg/L.

Od 92. ure bioprocesa se je koncentracija prostih amonijevih ionov konstantno dvigala do 800 mg/L, kar je bila verjetno posledica lize celic. Krivulja pH vrednosti v vzorcih iz bioreaktorja se je ujemala z meritvami v bioreaktorju, kot je prikazano na sliki 15.

Biosinteza eritromicina se je začela pri 20. uri bioprocesa in koncentracija ER je konstantno naraščala do konca bioprocesa do vrednosti 42 mg/L. Največja specifična hitrost biosinteze eritromicina je bila dosežena med 23. ter 62. uro bioprocesa in je znašala 0,86 mg/L/h.

Glede na višjo končno koncentracijo eritromicina ob koncu bioprocesa smo se odločili, da bomo enostopenjski način priprave vcepka uporabili pri nadalnjih eksperimentih v bioreaktorju.

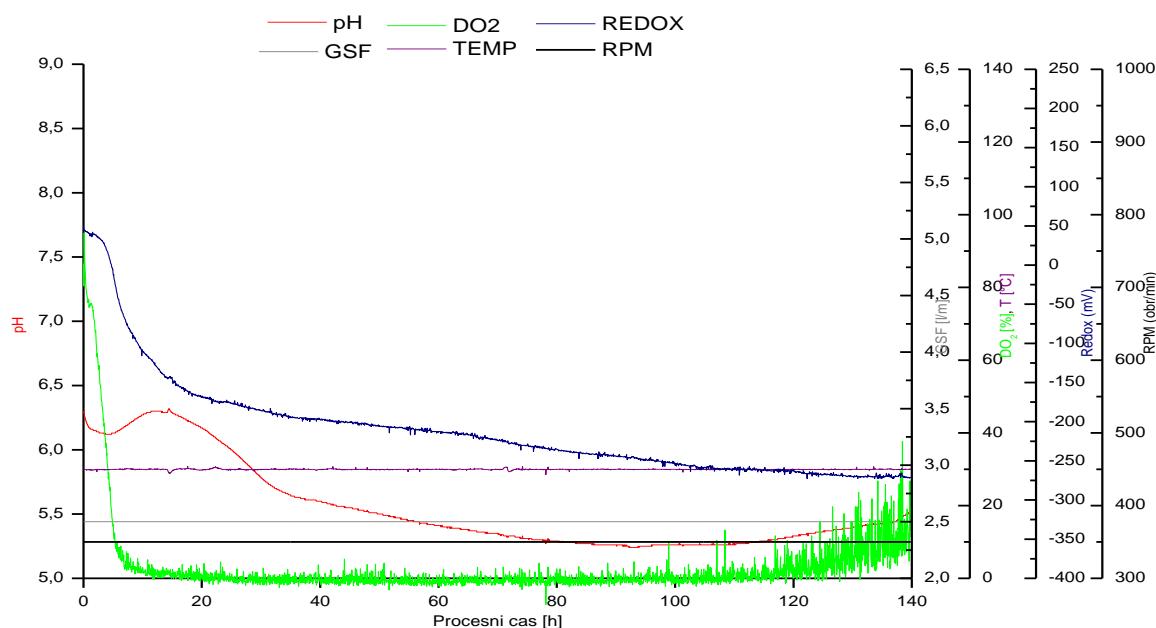
Na podlagi izvedenih preliminarnih eksperimentov smo ugotovili, da je zadostna oskrba kulture s kisikom zelo pomembna v začetnih fazah bioprocesa (prvih 60 h bioprocesa), zato smo pri naslednjih eksperimentih preučevali kako oskrba s kisikom vpliva na produkcijo eritromicina in povezavo z vrednostjo redoks potenciala. Poleg tega pa smo želeli v naslednji stopnji ovrednotiti tudi vpliv dohranjevanja glukoze na produkcijo eritromicina. Prvi poskusi produkcije eritromicina v bioreaktorjih so tudi pokazali, da se najprej porabi glukoza, kar je pričakovano glede na to, da je glukoza za bakterije najlažje dostopen vir ogljika in se je porabila predvsem za tvorbo biomase.

4.2.2 Vpliv oskrbe s kisikom na produkcijo eritromicina

Ker smo želeli določiti vpliv oskrbe s kisikom na produkcijo eritromicina in preučiti karakteristike redoks potenciala pri bioprocесu produkcije eritromicina, smo izvedli dva eksperimenta. Pri prvem eksperimentu smo namenoma povzročili limitacijo s kisikom tekom celotnega bioprocesa z vodenjem bioprocesa pri nizkih obratih mešanja in nizkim pretokom zraka. Pri drugem poskusu smo od začetka inokulacije bioreaktorja nastavili maksimalno visoke obrate mešanja in visok pretok zraka. Z visokimi obrati mešanja in visokim pretokom zraka smo želeli omogočiti čim bolj optimalno oskrbo bioprocesa s kisikom. Gibanje vrednosti redoks potenciala ne smejo biti pospoljene med različnimi bioprocесi, vendar jih je potrebno preučiti za vsak bioprocес z posebej (Berovič in sod., 2011), zato smo z zgoraj opisanimi načinoma vodenja bioprocesa želeli poleg vpliva oskrbe s kisikom na produkcijo eritromicina, preučiti tudi karakteristike redoks potenciala pri bioprocесu produkcije eritromicina.

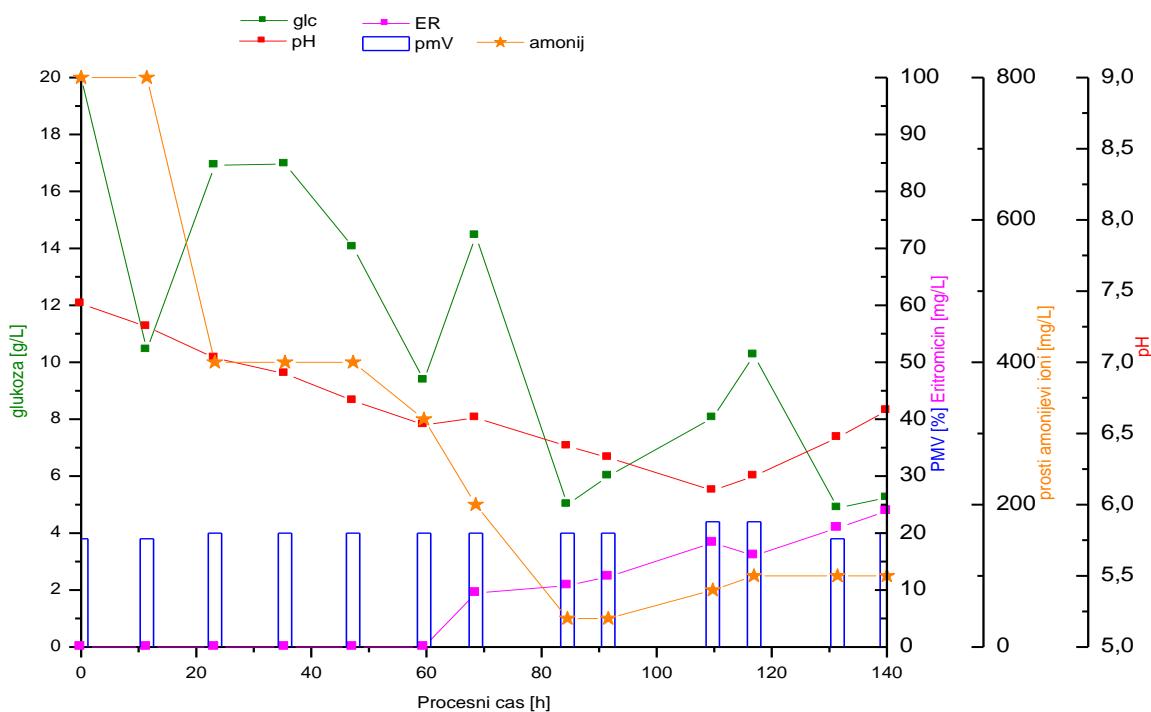
4.2.2.1 Vodenje bioprocesa pri limitaciji s kisikom

Za preučevanje vpliva limitacije s kisikom na produkcijo eritromicina smo vodili bioprocес pri konstantni hitrosti mešanja 350 rpm in pretokom zraka (2,5 L/min (volumen zraka na minuto)).



Slika 16: Časovni potek bioprocesa z enostopenjskim vcepkom vodenem pri konstantni hitrosti mešanja 350 rpm in pretokom zraka (2,5 l/min), ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, odstotek raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja (Legenda: pH-pH vrednost, GSF-pretok zraka (l/min), TEMP-temperatura (°C), DO₂- odstotek raztopljenega kisika (%), REDOX-redoks potencial (mV), RPM-hitrost mešanja (obr/min)).

Na sliki 16 je prikazan potek bioprocesa pri minimalnih pogojih aeracije, kjer smo neprekinjeno spremljali vrednosti pH, temperature, odstotek raztopljenega kisika, redoks potenciala, pretoka zraka in hitrosti mešanja. Pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom vodenem pri konstantni hitrosti mešanja 350 rpm, pretokom zraka 2,5 L/min in temperaturo 30 °C. Kot smo že omenili, je ciljna minimalna vrednost DO₂ v laboratorijskih bioreaktorjih 30 %, ki je nismo mogli zagotoviti pri postopnem večanju števila obratov in pretoka zraka pri biopresusu z enostopenjskim (Slika 12) in dvostopenjskim vcepkom (Slika 14). Ker pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom in limitacijo s kisikom nismo dvigovali niti števila obratov, niti pretoka zraka, je DO₂ padel na 0 % (poraba raztopljenega kisika je bila večja, kot dovajanje kisika v bioreaktor) že pri 8. uri biopresusa in je stagniral do zaključka biopresusa. Vrednost redoks potenciala je sovpadala s trendom gibanja vrednosti DO₂, vendar z zamikom 12 ur. Vrednosti redoks potenciala so se hitro znižale do 20. ure biopresusa, po tej uri pa je bilo nižanje vrednosti redoks potenciala veliko počasnejše do konca biopresusa. Najvišja vrednost redoks potenciala je bila na začetku biopresusa (50 mV) in najnižja na koncu biopresusa (-255 mV). Tako lahko predvidevamo, da je limitacija s kisikom vedno bolj negativno vplivala na kulturo v bioreaktorju, kar je bilo pričakovano glede na to, da je metabolizem *S. erythraea* zelo intenziven ter za rast in produkcijo eritromicina potrebuje dobro oskrbo s kisikom. pH vrednost je naraščala do 18. ure biopresusa, kar je bilo v nasprotju z vrednostjo redoks potenciala in DO₂, ki sta v začetku procesa hitro padali. Nato pa se je vrednost pH konstantno nižala do zaključka biopresusa.



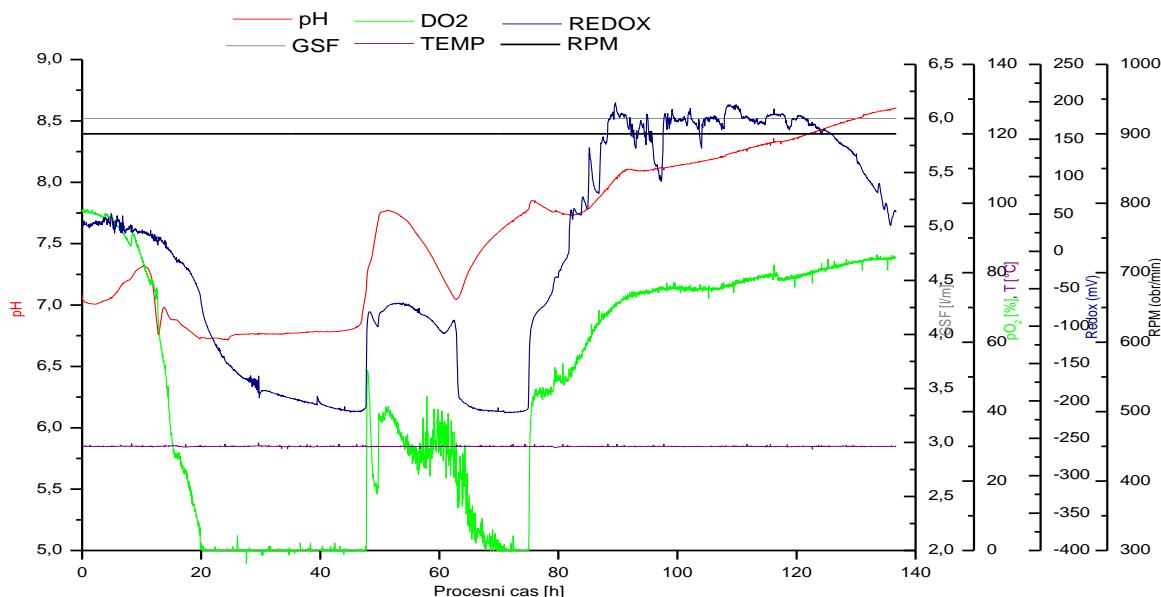
Slika 17: Časovni potek bioprocesa z enostopenjskim vcepkom vodenem pri konstantni hitrosti mešanja 350 rpm in pretokom zraka (2,5 l/min), ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, odstotka PMV in koncentracije protih amonijevih ionov (Legenda: glc-koncentracija glukoze (g/L), pH-pH vrednost, ER-koncentracija eritromicina (mg/L), PMV-zbiti micelični volumen (%), amonij-koncentracija prostih amonijevih ionov (mg/L)).

Tekom bioprocesa z enostopenjskim vcepkom in limitacijo s kisikom smo odvzemali vzorce in izvedli analize v laboratoriju (Slika 17). Tako smo dobili točkovne meritve vrednosti pH in PMV ter koncentracije glukoze, eritromicina in prostih amonijevih ionov. Vrednost PMV (Slika 17) je bila na začetku bioprocesa 20 % in se je nekoliko povečala v 110. in 118. uri bioprocesa (22 %). Začetna koncentracija glukoze je bila 20 g/L in se je tokom bioprosesa počasi zniževala, vendar se ni porabila do konca, kot je bilo to v biopresusu z enostopenjskim (Slika 15) in dvostopenjskim vcepkom (Slika 13). Koncentracija prostih amonijevih ionov, ki je bila na začetku procesa 800 mg/L, je pri 23. urah padla na 400 mg/L in se več ni spremenjala do 48. ure biopresusa. Nato se je vrednost koncentracije prostih amonijevih ionov začela nižati do 85. ure, ko je dosegla minimalno vrednost (40 mg/L) in se je vzdrževala pri tej vrednosti do zaključka biopresusa. Vrednost pH je konstantno padala do 110. ure biopresusa (6,3), nato se je dvigala do konca biopresusa, ko je dosegla vrednost 6,8.

Biosinteza eritromicina se je začela pri 60. uri biopresusa in končna koncentracija ER je bila 23 mg/L. Največja specifična hitrost biosinteze eritromicina je bila dosežena med 60. in 110. uro in je znašala 0,37 mg/l/h. Ker je kulturi primanjkovalo kisika, je bila poraba glukoze nižja in s tem tudi biosinteza eritromicina. Posledično je bila tudi končna koncentracija eritromicina izredno nizka.

4.2.2.2 Vodenje bioprocesa z dobro oskrbo s kisikom

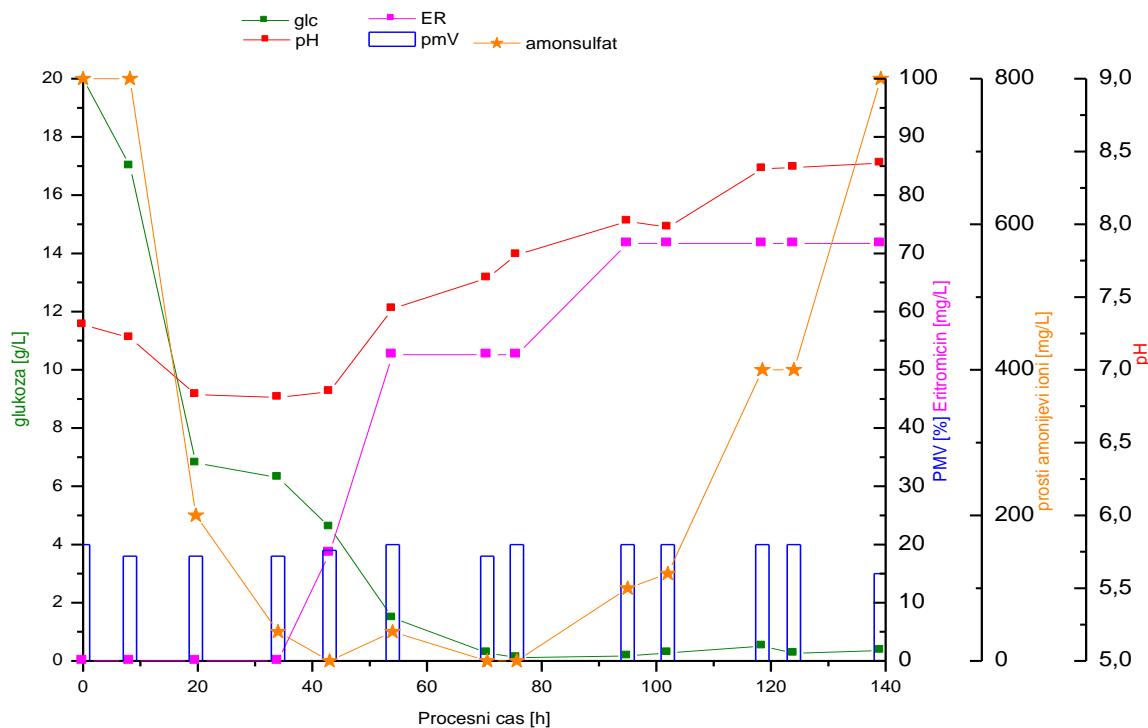
Z visokimi obrati mešanja in povečanim pretokom zraka smo želeli preučiti kako optimalno dovajanje kisika vpliva na biosintezo eritromicina v biopresusu. S tem poskusom smo lahko opazovali trend vrednosti redoks potenciala, ki ni bil odvisen od pogojev mešanja in pretoka zraka, vendar od vpliva metabolizma kulture.



Slika 18: Časovni potek bioprocesa z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretoku zraka 6 L/min, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotka raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja (Legenda: pH-pH vrednost, GSF-pretok zraka (l/min), TEMP-temperatura (°C), DO₂-odstotka raztopljenega kisika (%), REDOX-redoks potencial (mV), RPM-hitrost mešanja (obr/min)).

Na sliki 18 je prikazan potek bioprocesa pri maksimalnih pogojih dovajanja kisika (glede na karakteristike uporabljenih bioreaktorjev), kjer so se spremljale vrednosti pH, temperature, odstotka raztopljenega kisika, redoks potenciala, pretoka zraka in hitrosti mešanja. Pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min, smo želeli doseči najboljšo možno preskrbo s kisikom, vendar nam še vedno ni uspelo zagotoviti minimalno vrednost DO₂ (30 %) do 75. ure biopresusa. DO₂ je narasel pri 45. uri biopresusa pri 75. uri biopresusa ter zopet padel na 0 % (poraba raztopljenega kisika je bila večja, kot dovajanje kisika v bioreaktor), nato je vrednost začela naraščati vse do konca biopresusa. Spreminjanje vrednosti redoks potenciala pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min (Slika 18), se ujemajo s trendom vrednosti redoks potenciala pri biopresesih z enostopenjskim in dvostopenjskim vcepkom (Slike 12 in 14). Pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min, smo opazili tudi, da se v času prvih 18. urah biopresusa vrednost pH ni bistveno spremnjala in je nato padla na vrednost pH 6,8 pri 15. uri biopresusa in se je gibala blizu te točke do 45. ure biopresusa (Slika 18). Pri 45. uri biopresusa so se vrednosti pH, redoks

potenciala ter DO_2 hitro dvignile in tudi hitro znižale do 75. ure bioprocesa. Trenda vrednosti redoks potenciala in DO_2 sta imela tri manjše dvige vrednosti pri 45., 55. in 60. uri bioprocesa, medtem ko je bil trend dviga pH vrednosti enoten in je dosegel maksimalno vrednost (7,9) pri 55. uri bioprocesa. To verjetno zopet nakazuje na boljšo odzivnost elektrod za merjenje redoks potenciala in DO_2 v primerjavi z elektrodo za merjenje vrednosti pH. Vrednost pH se je tudi začela dvigati po 65. uri bioprocesa, medtem ko sta se vrednosti redoks potenciala in DO_2 začeli dvigati po 75. uri bioprocesa. Pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min (Slika 18), so se dvigi vrednosti redoks potenciala, DO_2 in pH vrednosti pojavili ob podobnem časovnem obdobju bioprocesa kot pri biopresesih z enostopenjskim in dvostopenjskim vcepkom (Slika 12 in 14). Vendar so bile spremembe v vrednostih pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min bolj izrazite (Slika 18), kot pri ostalih dveh biopresesih (Sliki 12 in 14). Razlika v trendu gibanja vrednosti redoks potenciala, DO_2 in vrednosti pH med biopresesi z enostopenjskim vcepkom (Slika 12), dvostopenjskim vcepkom (Slika 14) ter enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min, je bila odsotnost dviga vrednosti redoks potenciala in DO_2 v prvih 20. urah biopresusa (Slika 18).



Slika 19: Časovni potek biopresusa z enostopenjskim vcepkom vodenem pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min, ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, vrednosti PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov (Legenda: glc-koncentracija glukoze (g/L), pH-pH vrednost, ER-koncentracija eritromicina (mg/L), PMV-zbiti micelični volumen (%), amonij-koncentracija prostih amonijevih ionov (mg/L)).

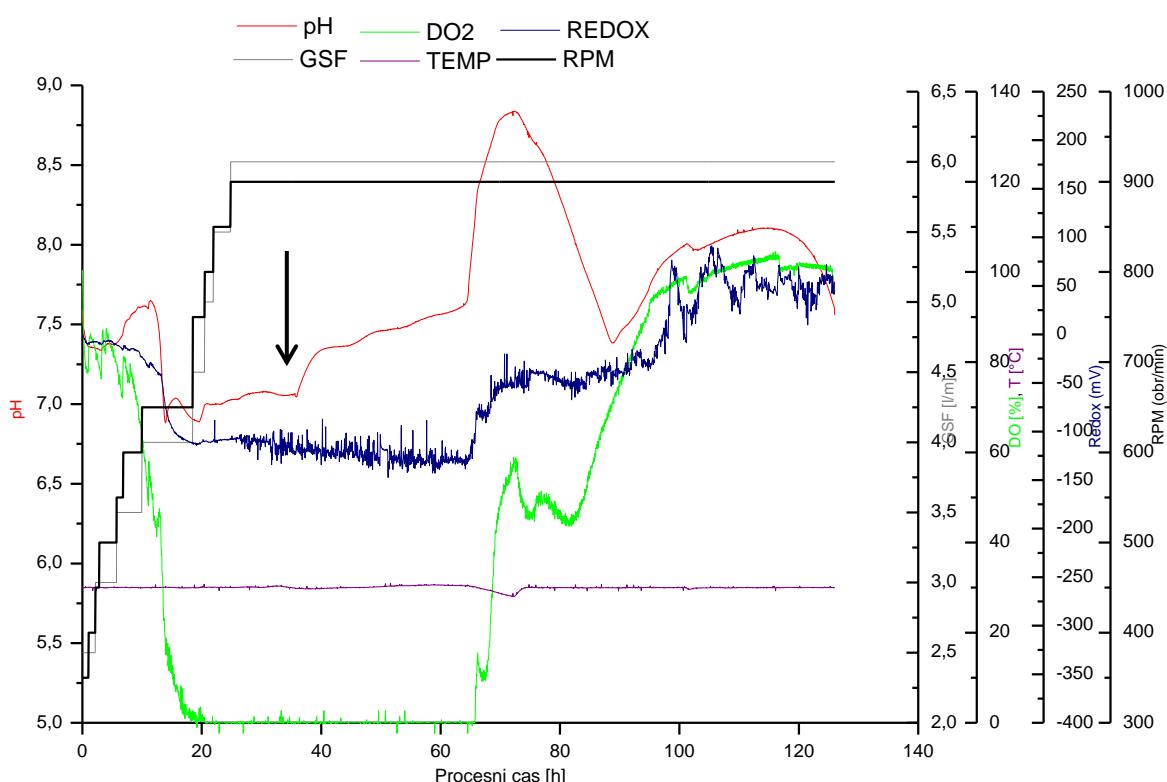
Tekom bioprocesa z enostopenjskim vcepkom in najboljšo možno oskrbo s kisikom (Slika 19) smo odvzemali vzorce na katerih smo izvedli analize v laboratorijih. Dobili smo meritve vrednosti pH in PMV ter koncentracije glukoze, eritromicina in prostih amonijevih ionov. Vrednost PMV je bila na začetku bioprocesa 20 % in se tokom poteka bioprocesa ni bistveno spremajala ($\pm 2 \%$). Iz slike 19 tudi vidimo, da je bila začetna koncentracija glukoze 20 g/L, glukoza se je porabila pri 70. uri bioprocesa. Koncentracija prostih amonijevih ionov je bila na začetku bioprocesa 800 mg/L in je padla na minimalno koncentracijo (0 mg/L) pri 42. uri bioprocesa ter se je do 75. ure bioprocesa gibala blizu te točke. Po 75. uri bioprocesa je začela vrednost koncentracije prostih amonijevih ionov naraščati do konca bioprocesa. To naraščanje vrednosti koncentracije prostih amonijevih ionov je bila lahko posledica pomanjkanja glukoze (glukoza se je porabila pri 70. uri bioprocesa). Vrednost pH se je znižala iz 7,3 na 6,8 do 20. ure bioprocesa ter se je do 42. ure bioprocesa gibala okoli te točke (Slika 19). Od 42. ure naprej pa se je vrednost pH konstantno višala do zaključka biopresesa, kar je sovpadalo s porabo glukoze in višanjem koncentracije prostih amonijevih ionov.

Biosinteza eritromicina se je začela po 32. urah biopresesa in koncentracija ER je naraščala do 90. ure biopresesa. Med 45. in 75. uro biopresesa se je biosinteza eritromicina začasno ustavila, saj se v tem obdobju koncentracija eritromicina ni višala. Biosinteze eritromicina se je po 90. uri biopresesa (Slika 19) ustavila. Najvišja koncentracija eritromicina je bila dosežena okrog 90. ure biopresesa in je znašala 73 mg/l. Največja specifična hitrost produkcije je bila dosežena med 35. in 54 uro in je znašala 2,63 mg/l h.

Na podlagi primerjalnih eksperimentov, kjer smo izvajali vodenja biopresesov z limitacijo s kisikom in to primerjali s procesom z dobro oskrbo s kisikom smo lahko ugotovili, da je dobra oskrba s kisikom kritična za dobro biosintezo eritromicina, kar je bilo seveda pričakovano. Ključno za uspeh biopresesa pa je dohranjevanje s pomembnim virom ogljika (glukoza), zato smo v nadaljevanju magistrskega dela izvajali eksperiment z dohranjevanjem glukoze.

4.2.3 Vpliv dohranjevanja glukoze na biosintezo eritromicina

V preliminarnih eksperimentih smo ugotovili, da se glukoza kot glavni vir ogljika porabi zelo hitro v začetnih fazah bioprocesa (Slika 13, 15 in 19), zato smo želeli preučiti vpliv načina dohranjevanja glukoze na biosintezo eritromicina. Bioproses smo vodili s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka glede na vrednosti DO₂. Pri 35. urah bioprocesa smo dodali glukozo (10 g/L) (Slika 20, puščica označuje dodatek glukoze v bioreaktor).

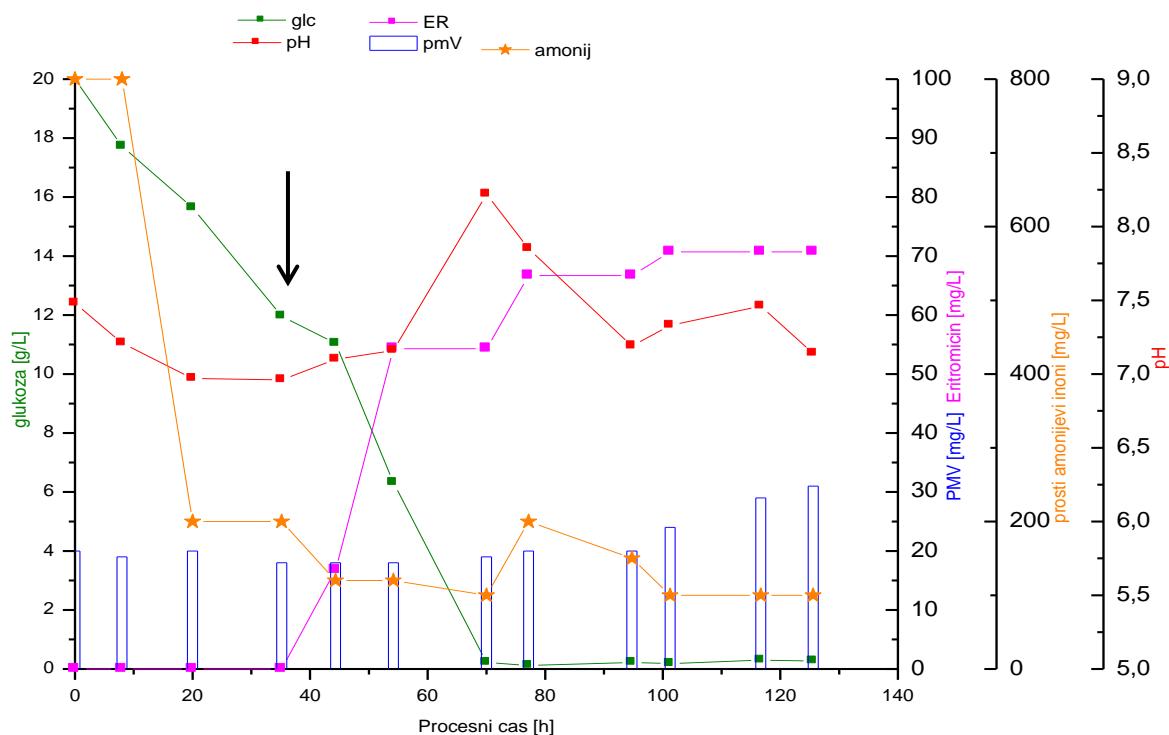


Slika 20: Časovni potek bioprocesa z enostopenjskim vcepkom, vodenem s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja ter pretoka zraka in dohranjevanjem glukoze (puščica) pri 35. uri bioprocesa, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotka raztopljenega kisika, redoks potenciala in hitrosti mešanja (Legenda: pH-pH vrednost, GSF-pretok zraka (l/min), TEMP-temperatura (°C), DO₂-odstotek raztopljenega kisika (%), REDOX-redoks potencial (mV), RPM-hitrost mešanja (obr/min)).

Na sliki 20 je prikazan potek bioprocesa z enostopenjskim vcepkom z dohranjevanjem glukoze pri 35. uri bioprocesa, vodenem s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka. Vrednosti pH, temperature, DO₂, redoks potenciala, pretoka zraka in hitrosti mešanja so se neprekinjeno spremljale. Bioproses z enostopenjskim vcepkom z dohranjevanjem smo začeli pri hitrosti mešanja 350 rpm, pretokom zraka 2,5 l/min in temperaturi 30 °C. Temperaturo smo vzdrževali konstantno tekom bioprocesa, medtem ko smo pretok zraka in obrate mešala postopno dvigovali do 24. ure bioprocesa, da bi zagotovili zadostno oskrbo kulture s kisikom. Tako kot pri ostalih biopresesih (Slika 12, 14 in 18), tudi pri biopresusu z enostopenjskim vcepkom z dohranjevanjem nismo uspeli

vzdrževati v minimalne vrednosti DO₂ (30 %) saj je DO₂ padel na 0 % pri 20. urah bioprocesa. V obdobju med 20. in 65. uro bioprocesa je bila vrednost DO₂ 0%, in je po 65. uri bioprosesa začela naraščati vse do konca bioprosesa. Trendu vrednosti DO₂ je na enak način sledila vrednost tudi redoks potenciala. Opazili smo tudi dvig vrednosti pH med 65. in 82. uro bioprosesa.

Dodatek glukoze v 35. uri bioprosesa (Slika 20) je povzročil zamik dviga vrednosti pH, redoks potenciala in DO₂, saj so se vrednosti teh parametrov začele dvigovati za 10 - 15 h kasneje v primerjavi z ostalimi biopresesi (Slika 12, 14 in 18). Pri ostalih biopresesih so se dvigi vrednosti pH, redoks potenciala in DO₂ zgodili med 50. in 70. urami bioprosesa (Slika 12, 14 in 18), medtem ko so se pri biopresusu z dohranjevanjem dvigi vrednosti pH, redoks potenciala in DO₂ pojavili po 70. urah procesa (Slika 20). Posledica zamika je bil najverjetnejše dodatek glukoze v 35. uri bioprosesa. Predvidevamo, da dohranjevanje z glukozo povzročilo dvig v pH vrednosti (iz 7,0 na 7,3) ter omogočilo daljšo stacionarno fazo in kasnejši metabolni preklop kulture na komponente gojišč iz sojine moke.



Slika 21: Časovni potek biopresesa z enostopenjskim vcepkom, vodenem s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka in dohranjevanjem glukoze pri 35. uri biopresesa (puščica), ki je bil pridobljen z analizami v laboratoriju vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, vrednosti PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov (Legenda: glc-koncentracija glukoze (g/L), pH-pH vrednost, ER-koncentracija eritromicina (mg/L), PMV-zbiti micelični volumen (%), amonij-koncentracija prostih amonijevih ionov (mg/L)).

Tekom biopresusa z enostopenjskim vcepkom z dohranjevanjem glukoze pri 35. uri biopresusa (Slika 21) smo odvzemali vzorce in izvedli analizo v laboratoriju. Pridobili smo meritve vrednosti pH in PMV ter koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina in

prostih amonijevih ionov. Začetna PMV vrednost brozge je bila 20% in je proti koncu bioprocesa vrednost narasla na 30%. Dvig v vrednosti PMV po 95. uri bioprocesa bi lahko razložili, kot posledico dodatka glukoze, saj je to verjetno omogočilo boljšo rast in tvorbo biomase ter odložilo lizo celic v zaključnih fazah bioprocesa. Začetna koncentracija glukoze je bila 20 g/L in se je zaradi dodatka glukoze v 35. uri bioprocesa verjetno podaljšal čas porabe glukoze v bioreaktorju (puščica na sliki 21 označuje čas dohranjevanja glukoze). V 70. uri bioprocesa se je glukoza porabila. Koncentracija prostih amonijevih ionov je bila na začetku bioprocesa 800 mg/L in za razliko od ostalih bioprocесов (Slika 13, 15, 17 in 19), koncentracija amonijevih ionov ne pade na 0 mg/L, vendar je bila minimalna vrednost koncentracije prostih amonijevih ionov okoli 100 mg/L (Slika 21). Pri 77. uri bioprocesa se je vrednost koncentracije prostih amonijevih ionov dvignila na 200 mg/L, kar je sovpadalo s dvigom vrednosti pH, redoks potenciala in DO₂ na sliki 20. Trend gibanja pH vrednosti pri meritvah vzorcev bioprocesa v laboratoriju (Slika 21) so se ujemale z neprekinjenimi (»on-line«) meritvami bioprocesa v bioreaktorju (Slika 20).

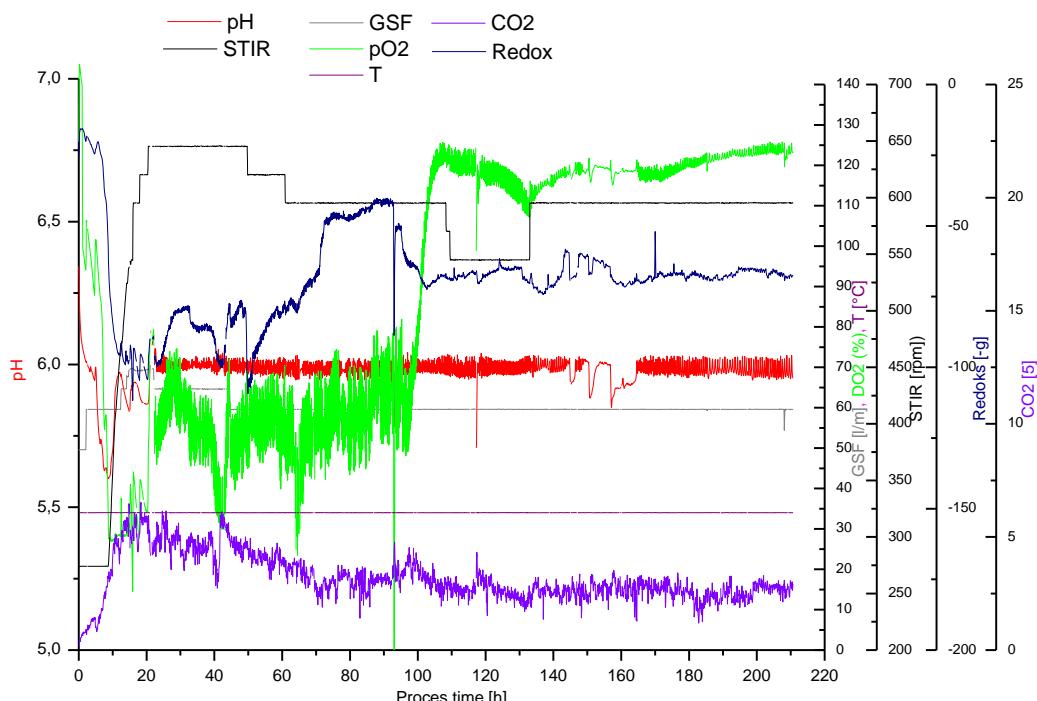
Biosinteza eritromicina se je začela po 35. urah bioprocesa in končna koncentracija ER je dosegla vrednost 72 mg/L eritromicina pri 100. uri bioprocesa. Najvišja specifična hitrost biosinteze eritromicina je bila dosegrena med 35. in 54. uro bioprocesa ter je znašala 2,86 mg/l/h. Dodatek glukoze v 35. uri bioprocesa je omogočil boljšo produkcijo eritromicina (Slika 21) v primerjavi s kontrolnim bioprocесом z enostopenjskim vcepkom (slika 13) pri katerem smo dosegli donos 42 mg/l. Na osnovi izvedenega eksperimenta smo potrdili da ima tudi dohranjevanje z glukozo pozitiven vpliv na produkcijo eritromicina.

4.3 REZULTATI BIOPROCESA V VEČJEM MERILU IN INDUSTRIJSKIH POGOJIH

Na podlagi izvedenih eksperimentov v laboratorijskem merilu smo pokazali, da je oskrba s kisikom, kot tudi dohranjevanje z glukozo ključnega pomena za biosintezo eritromicina. Ugotovili smo tudi, da ko sta bili vrednosti redoks potenciala in DO₂ na svojih najnižjih vrednostih, je imela kultura najvišjo metabolno aktivnost (koncentracija glukoze in prostih amonijevih ionov se nižata). Ne glede na to, da smo dohranjevali glukozo med bioprocесом, in ne glede na način priprave vcepka, se je biosinteza eritromicina začela v času okoli 40. ure bioprocesa. Le pri bioprocесу, ki smo ga vodili ob limitaciji s kisikom se je biosinteza eritromicina začela 20 ur kasneje, v primerjavi z ostalimi bioprocеси, kar potrjuje naša predvidevanja, da ima dostopnost kisika velik vpliv na biosintezo eritromicina.

Pridobljena znanja oziroma podatke pridobljene v laboratorijskem bioreaktorju volumna 5L z naravnim sevom *S. erythraea*, smo v nadaljevanju uporabili za preučevanje biosinteze eritromicina v večjem merilu, vendar tokrat je bil eksperiment izведен v podjetju Acies Bio d.o.o. z industrijskim sevom pod industrijskimi pogoji. Industrijski bioprocес je bil izведен z industrijskim sevom *S. erythraea* ABE006 v pilotnem (100 L) bioreaktorju

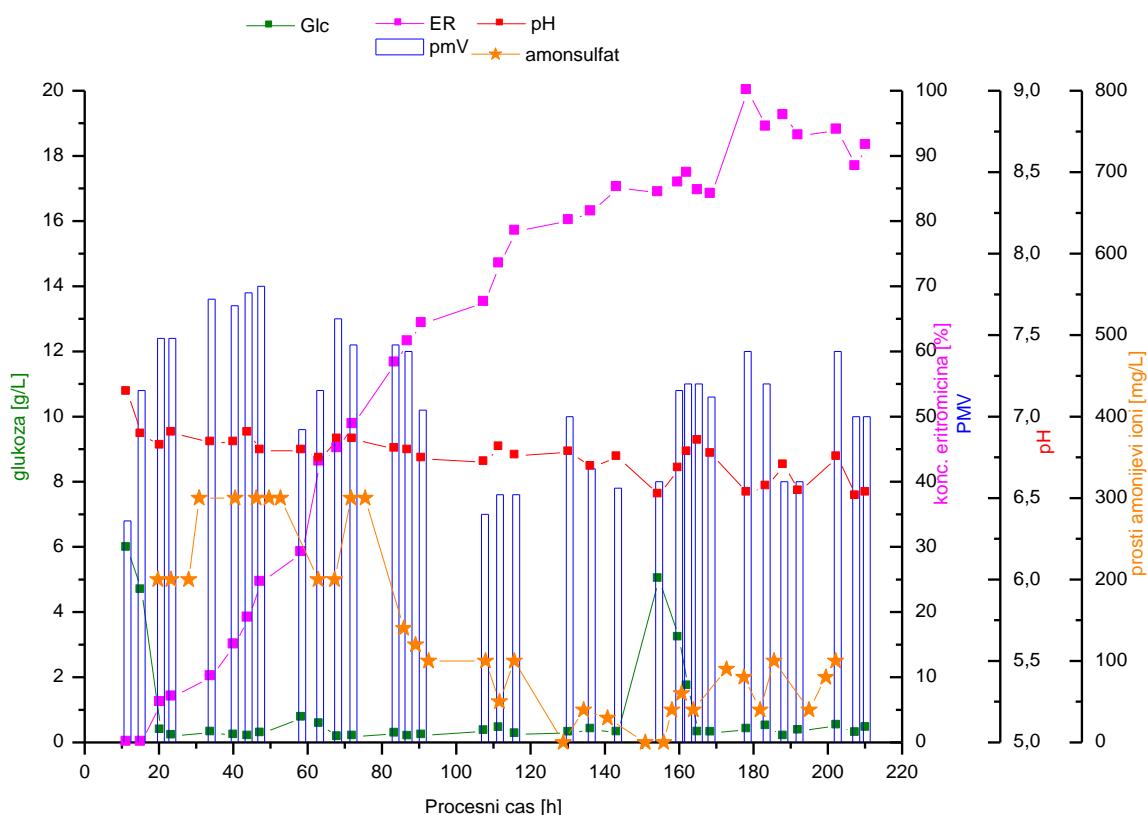
vodenem s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka. V pilotnem bioreaktorju volumna 100L smo uspešno zagotovili konstantno vzdrževanje DO₂ nad 30%, kar je preprečilo limitacijo oskrbe s kisikom tekom bioprocasa. Tekom bioprocasa smo konstantno vzdrževali vrednost pH in temperaturo ter dodatno dohranjevali vir ogljika (glukozo) in vir dušika (amonijev sulfat) ter tako vzdrževali primerno koncentracijo obeh virov med bioprocessom.



Slika 22: Časovni potek bioprocasa v 100 L pilotnem bioreaktorju, vodenem s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka ter kontinuirno dohranjevanje vira ogljika in dušika, ki je bil pridobljen z neposrednimi meritvami vrednosti pH, pretoka zraka, temperature, odstotka raztopljenega kisika, odstotka raztopljenega ogljikovega dioksida, redoks potenciala in hitrosti mešanja (Legenda: pH-pH vrednost, GSF-pretok zraka (l/min), T-temperatura (°C), pO₂-odstotek raztopljenega kisika (%), CO₂-odstotek raztopljenega CO₂ (%), REDOX-redoks potencial (mV), STIR-hitrost mešanja (obr/min)).

Na sliki 22 je prikazan potek bioprocasa v pilotnem bioreaktorju, kjer so se neprekinjeno spremljale vrednosti pH, temperature, DO₂, redoks potenciala, pretoka zraka in hitrosti mešanja. Bioproses v pilotnem bioreaktorju smo začeli voditi pri hitrosti mešanja 280 rpm, pretokom zraka 50 l/min (0,5 vvm) in temperaturi 30°C. Temperaturo smo vzdrževali konstantno tekom bioprocasa, medtem ko smo pretok zraka in obrate mešala postopno dvigovali do 24. ure bioprocasa, da bi zagotovili zadostno oskrbo kulture s kisikom. Želena minimalna vrednost raztopljenega kisika v bioreaktorjih je 30 %, ki smo jo tudi uspešno vzdrževali v bioprocесu v pilotnem bioreaktorju, kar je preprečevalo limitacijo s kisikom v začetni, intenzivni fazni rasti kulture. Minimalne vrednosti DO₂ (30 %) nismo mogli zagotoviti v laboratorijskih bioreaktorjih (Slika 12, 14, 16, 18 in 20). Po 100. urah

bioprocesa je vrednost DO_2 hitro narastla na maksimalnih 100. Pri biopresusu v pilotnem bioreaktorju smo spremljali tudi vsebnost ogljikovega dioksida v izhodnem zraku, ki je pomemben pokazatelj celičnega metabolizma aktinomicete, saj visok odstotek CO_2 pomeni, da aktinomiceta aktivno porablja kisik za celično respiracijo. Odstotek CO_2 in ta je bil najvišji med 20. in 50. uro biopresusa, nato je počasi upadal do konca biopresusa. V začetni fazi biopresusa vrednost pH ni bila vzdrževana in zato je tudi vrednost redoks potenciala na začetku biopresusa hitro padla na minimalno vrednost – 100 mV (Slika 22). Vrednosti redoks potenciala so se tekom biopresusa v kratkem časovnem intervalu dvignile pri 30., 45. uri ter med 70. in 100. uro biopresusa (Slika 22). V tem območju je bila vrednosti DO_2 relativno konstantna, kar nakazuje, da so spremembe v redoks potencialu lahko povezane s spremembami metabolizma določenih hranil, ki se nahajajo v produksijskem gojišču. Posebej zanimiv je bil dvig vrednosti redoks potenciala med 90. in 100. uro biopresusa (Slika 22), kjer je verjetno prišlo do pomanjkanja glukoze kar lahko vidimo na sliki 23. Med 90. In 100. uro biopresusa je kultura verjetno prešla iz hitre logaritemske faze rasti v stacionarno fazo rasti, kar se odraža na močnem dvigu vrednosti DO_2 . Po 140. urah biopresusa se je vrednost redoks potenciala gibala med -60 in -80 mV in nihanje vrednosti redoks potenciala med 140. in 160. uro biopresusa se je ujemalo z nihanjem vrednosti pH.



Slika 23: Časovni potek bioprocesa v 100 L pilotnem bioreaktorju, vodenem s postopnim dvigovanjem obratov mešanja in pretoka zraka ter kontinuirno dohranjevanje z ogljikom in dušikom, ki je bil pridobljen z analizami vrednosti pH, koncentracije glukoze, koncentracije eritromicina, PMV in koncentracije prostih amonijevih ionov (Legenda: Glc-koncentracija glukoze (g/L), pH-pH vrednost, ER-koncentracija eritromicina (mg/L), PMV-zbiti micelični volumen (%), amonsulfat-koncentracija prostih amonijevih ionov (mg/L)).

Tekom bioprosesa na pilotnem bioreaktoru smo odvzemali vzorce in izvedli analize v laboratoriju. Tako smo dobili meritve vrednosti pH in PMV ter koncentracije glukoze, eritromicina in prostih amonijevih ionov (Slika 23). Iz slike 23 razberemo, da je bila na začetku PMV vrednost 30 % in se je v 40. urah bioprosesa dvignila na 70 %, kar je bilo povezano z intenzivno rastjo biomase. Vrednost PMV je upadla na 30 % pri 100. uri bioprosesa in zopet na 35 % pri 140. uri bioprosesa (Slika 23). PMV vrednost do konca bioprosesa naraste iz 35 % na 60 %. Začetna koncentracija glukoze je bila 10 g/L. Glukoza se je skoraj v celoti porabila v prvih 20. urah bioprosesa. Koncentracijo glukoze smo po 20. urah bioprosesa vzdrževali pri koncentraciji okoli 0,5 – 1 g/L s konstantnim dohranjevanjem. Pri 150. uri bioprosesa se je koncentracija glukoze povisala, kar je bila posledica tehnične napake (Slika 23) in je tudi povzročila nihanja v vrednosti pH. Začetna koncentracija prostih amonijevih ionov je bila 200 mg/L in se je tekom bioprosesa vzdrževala med 100 mg/L in 300 mg/L z dohranjevanjem amonijevega sulfata. Pri 130. in 150. uri bioprosesa je koncentracija prostih amonijevih ionov padla na 0 mg/L, kar je bila posledica neoptimalnega vodenja bioprosesa (Slika 23).

Biosinteza eritromicina se je začela že pri 20. uri bioprocesa. Maksimalna specifična hitrost biosinteze eritromicina (78 mg/l/h) je bila dosegrena med 23. in 83. urami bioprocesa, kar je bilo povezano s načinom vodenja bioprocesa v pilotnem bioreaktorju. Med biopresosom v pilotnem bioreaktorju so se vzdrževali optimalna oskrba s kisikom, regulacija pH vrednosti, koncentracije glukoze in koncentracija prostih amonijevih ionov z namenom vzpostaviti pogoje za čim boljšo biosinteze eritromicina.

Iz pridobljenih rezultatov iz pilotnega merila vidimo, da je redoks potencial lahko uporabno orodje za sledenje celičnega metabolizma oz. biosinteze sekundarnih metabolitov, posebej v kontroliranih pogojih, kjer se vzdržujejo vrednosti DO_2 in pH. Tako so nam bili izvedeni eksperimenti v laboratorijskem merilu v veliko pomoč za boljše razumevanje oziroma boljše vodenje industrijskega biopresosa biosinteze eritromicina.

5 RAZPRAVA

Eritromicin je makrolidni antibiotik, ki ima velik pomen v zdravljenju infekcijskih bolezni kot so npr. respiratornih bolezni, ki jih povzročajo od gram pozitivne in nekatere gram negativne bakterije, zato je optimizacija njegove produkcije izjemnega pomena (El-Enshasy in sod., 2008). Eritromicin je sekundarni metabolit, produkt nitaste bakterije *Saccharopolyspora erythraea* s kompleksnim procesom biosinteze, na katerega imajo sestave gojišča in pogoji bioprocesa velik vpliv (El-Enshasy in sod., 2007). Na razvoju bioprocesa za produkcijo eritromicina v zadnjih 30 letih ni bilo narejeno veliko napredka. Že v osemdesetih letih je dosežen donos eritromicina, podoben današnjem z uporabo mutagenez in selekcijskih metod za izboljšavo produkcijskega seva in istočasno optimizacijo bioprocесов (Carata in sod., 2009). Pri optimizaciji bioprocesa je bila pozornost usmerjena predvsem na procesne parametre kot so pH, pretok zraka, DO₂, mešanje, temperatura, sestava gojišča, itd. Pri vseh teh razvojnih postopkih je bila uporaba meritve redoks potencial v ozadju. Raziskovalci Acies bio d.o.o. že nekaj časa delajo na procesu izboljševanja produkcije eritromicina s pomočjo visoko donosnega industrijskega seva bakterije *S. erythraea* ABE006. Uporabili so predvsem dva pristopa, genetski pristop s prekomernim izražanjem oz. prekinivijo tarčnih genov in klasični pristop z naključno mutagenezo bakterije ter optimizacijo gojišča in bioprocесних pogojev. Cilj magistrskega dela pa je bil preučevanje korelacije redoks potenciala s produkcijo eritromicina ter ostalih bioprocесnih parametrov, z namenom boljšega razumevanja in lažjega vodenja bioprocesa. Zato smo v sklopu te magistrske naloge izvajali meritve redoks potenciala pri različnem načinu vodenju bioprocesa v laboratorijskem bioreaktorju, v upanju da nam bodo podatki pridobljeni v teh eksperimentih omogočili boljše razumevanje in lažje vodenja bioprocesa v industrijskem merilu.

Prvi korak pri optimizaciji bioprocesa v laboratorijskem bioreaktorju je bil ovrednotenje različnih gojišč na stresalniku (falkonke). Testirali smo različna sporulacijska, vegetativna in produkcijska gojišča ter izbrali najboljšo kombinacijo za produkcijo eritromicina (Slika 11). Cilj naloge ni bil razvoj popolnoma novega gojišča, ker bi obseg dela magisterija vsebinsko in časovno presegel realne možnosti za pravočasen zaključek magistrske naloge, in smo se zato predvsem osredotočili v delo na nivoju razvoja bioprocesa v laboratorijskem bioreaktorju. Ugotovili smo, da na sporulacijskem CM6 agarnem gojišču, visoko donosni sev *S. erythraea* ABE006 odlično sporulira. V primerjavi z visokodonosnim sevom pa divji tip *S. erythraea* slabše sporulira. Kljub slabši sporulaciji naravnega seva na CM6 gojišču, divji tip seva *S. erythraea* doseže enako ali celo boljšo produkcijo eritromicina v primerjavi s sporulacijskimi gojišči, ki divjemu tipu seva omogočijo boljšo sporulacijo. Torej, čeprav na nekaterih gojiščih divji sev boljše sporulira, povečana intenzivnost sporulacije ni rezultirala v višjih donosih.

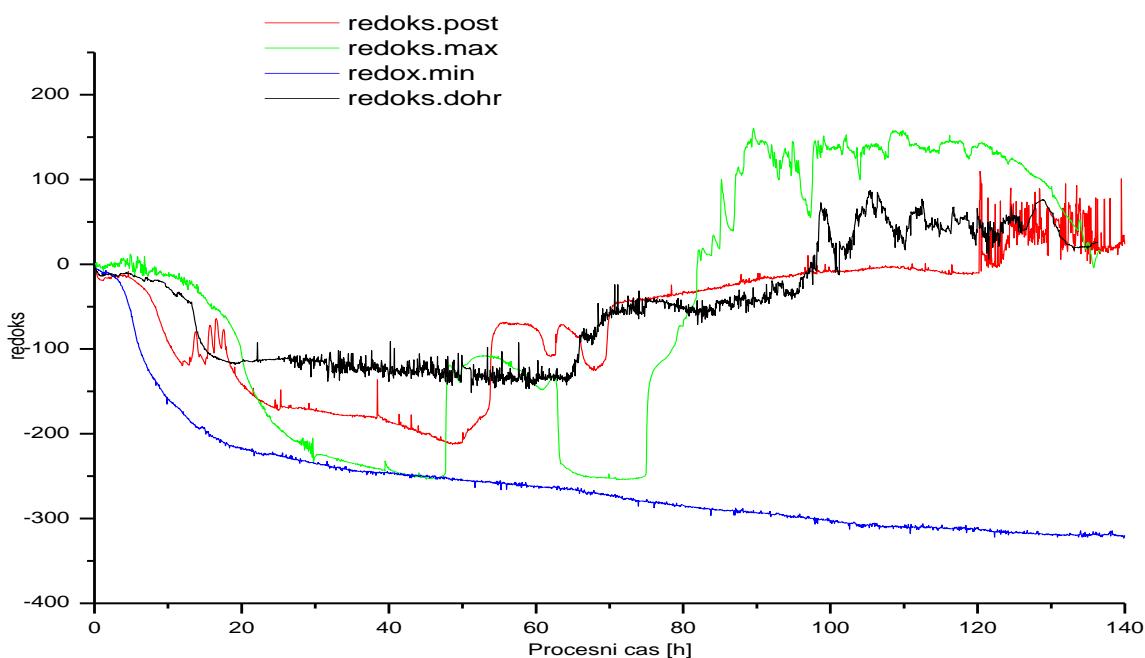
Najboljšo produkcijo sta omogočila vegetativno gojišče EVL in produkcijsko gojišče EFL. Vegetativno gojišče EVL je podpiralo izjemno dobro rast divjega tipa seva, kljub relativno

slabi sporulaciji le tega na sporulacijskem gojišču CM6. Producjsko gojišče EFL (vsebuje veliko sojine moke in koruznega škroba) je omogočilo hitro tvorbo biomase in najvišji donos eritromicina. Vendar je potrebno vzeti v obzir, da je dobro pripravljen vcepek v vegetativnem gojišču EVL imel ključen vpliv na biosintezo eritromicina v producjski fazi v falkonkah. Testiranje in izbor najboljše kombinacije sporulacijskega, vegetativnega in produktivnega gojišča je bilo bistvenega pomena za nadaljnje optimizacije biosinteze eritromicina z različnimi načini vodenja bioprocessa v laboratorijskem bioreaktorju.

Pri optimizaciji biosinteze eritromicina v laboratorijskih bioreaktorjih, smo z različnimi pristopi vodenja bioprosesov določili faze rasti kulture in sledili pomembne podatke, kot sta npr. začetek produkcije eritromicina in porabo substratov (glukoza) skozi celoten bioprocес. Leta 1992 so Kwong in sod. opisali poskus v katerem so sledili točke začetne rasti celic in porabo substrata s pomočjo meritve redoks potenciala in DO_2 v biopresesni brozgi. Skupina Lin in sod. (2005) je produkcijo klavulanske kisline z bakterijo *Streptomyces clavuligerus* in sledenjem redoks potencialom uspela demonstrirati, da ta dva parametra tesno korelirata med sabo. To pomeni, da se meritve redoks potenciala lahko uporablja kot orodje za sledenje mikrobne aktivnosti v času biosinteze sekundarnih metabolitov (Lin in sod., 2005). Naša skupina v preteklosti z meritvami z redoks potencialom kot edinim parametrom ni uspela določiti faze rasti mikroorganizma med biopresesom, vendar smo sedaj lahko s sledenjem spreminjanja vrednosti redoks potenciala, DO_2 , pH in koncentracije prostih amonijevih ionov določili pomembne faze rasti in ključne točke v biopresesu za produkcijo eritromicina.

V prvih 20. urah biopresesa smo pri vseh poskusih v bioreaktorju ne glede na načini vodenja biopresesa opazili hitro znižanje redoks potenciala v negativne vrednosti. Istočasno smo opazili tudi nižanje DO_2 . Sprememba redoks potenciala v negativne vrednosti v inokuliranem gojišču kaže na hiter začetek rasti. Hitrost in trajanje v katerem postane redoks potencial bolj negativen je odvisno od hitrosti rasti bakterije (Jacob, 1970). Tako lahko ugotovimo, da bakterija *S. erythraea* v prvih 20. urah biopresesa izredno hitro raste je v eksponentni fazi rasti, kar se odraža tudi na veliki porabi kisika, dvigu pH vrednosti in hitremu padcu koncentracije prostih amonijevih ionov. S hitro rastjo biomase bi pričakovali tudi dvig vrednosti PMV v prvih 20. urah biopresesa. Vendar vsebuje producjskem gojišču EFL veliko netopnih sestavin, ki so se med centrifugiranjem usedle skupaj z bakterijsko biomaso in vplivale na meritve PMV vrednosti. Tako PMV vrednosti ni najboljši pokazatelj bakterijske rasti na začetku biopresesa, vendar vseeno odraža stanje v procesu. Za sledenje biopresesa, ki je neposredno povezan s tvorbo biomase, smo se usmerjali na meritve DO_2 in koncentracije glukoze v brozgi. Vrednosti DO_2 in koncentracija glukoze sta se v začetnih stopnjah biopresesa hitro nižala, kar je posledica hitrega nastajanja biomase *S. erythraea*. Vendar se prvih 10. urah biopresesa vrednosti redoks potenciala, DO_2 , pH in koncentracije prostih amonijevih ionov ne spreminja, kar nakazuje na fazo prilagajanja kulture.

Eksponentni fazi rasti sledi stacionarna faza. Pri aktinomiceti *S. erythraea* je za stacionarno fazo značilna počasnejša rast in produkcija sekundarnih metabolitov (Marcellin in sod., 2013). Tako smo pri laboratorijskih bioprocесih ugotovili zmanjševanje tvorbe biomase po 20. urah bioprocesa, saj se PMV vrednost ni večala, kar pa ne pomeni, da je kultura prešla iz eksponentne faze rasti v stacionarno fazo. Nespremenjena vrednosti PMV tekom bioprocesa še ne pomeni, da biomasa ne nastaja, vendar je tvorba biomase enako hitra kot njeno odmiranje. Stacionarna faza pri aktinomiceti v laboratorijskih bioreaktorjih je nastopila okoli 40. ure bioprocesa, medtem ko je v pilotnem bioreaktorju nastopila v 20. uri bioprocesa. In sicer je bilo za stacionarno fazo bioprocesa produkcije eritromicina značilna vrednost DO₂ 0 %, minimalna vrednost redoks potenciala in začetek produkcije eritromicina. V stacionarni fazi rasti se še vedno tvori biomasa in sicer je tvorba biomase enako hitra kot njeno odmiranje. V stacionarni fazi energijo pridobljeno iz glukoze aktinomiceta porablja za vzdrževanje in nastanek nove biomase ter za vse celične procese, vključno z biosintezo prekurzorjev za eritromicin in encime za njegovo biosintezo. Biosinteza eritromicina se tako začne z zamikom, saj gre za reguliran proces (Kirm in sod., 2013). Povprečno je faza produkcije eritromicina trajala okoli 50 ur, le pri biopresusu z dohranjevanjem z glukozo se je produksijska faza podaljšala na 70 ur (Slika 24). Med stacionarno fazo rasti smo opazili tudi diavksično rast aktinomicete *S. erythraea*, ko je celice iz primarnega vira ogljika (glukoza) preklopijo metabolizem na sekundarni vir ogljika (sojina moka in koruzni škrob). Ta metabolni preklop je povzročila popolna asimilacija glukoze (poraba glukoze), kar se je odražalo v dvigu vrednosti pH, dvigu vrednosti redoks potenciala in DO₂.



Slika 24: Povzetek časovnih potekov normaliziranih vrednosti redoks potencialov iz vseh izpeljanih biopresov z enostopenjskim vcepkom (Legenda: redoks.post-vodenje biopresova s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka, redoks. max-vodenje biopresova pri hitrosti mešanja 900 rpm in pretokom zraka 6 l/min, redoks. min-vodenje biopresova pri hitrosti mešanja 350 rpm in pretokom zraka 2,5 l/min, redoks. dohr-vodenje biopresova z dohranjevanjem z glukozo ter s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka).

Faza odmiranja, je zadnja faza rasti bakterije. Pri biopresih smo jo določili s hitrim dvigom vrednosti DO_2 in dvigom vrednosti redoks potenciala. Proti koncu biopresova vrednost redoks potenciala postane bolj pozitivna zaradi znižanja metabolnih aktivnosti v celici in pojava lize celic (Jacob, 1970).

Ko smo lahko glede na spreminjanje vrednosti redoks potenciala določili faze rasti bakterije, smo z različnimi eksperimenti vodenja biopresova žeeli ugotoviti kolikšen vpliv imata dostopnost kisika in dohranjevanje glukoze na biosintezo eritromicina. Žeeli smo ugotoviti ali je mogoče optimizirati biopres ozziroma slediti potek biopresova bolj precizno, ter na ta način doseči višji donos eritromicina s pomočjo sledenja vrednosti redoks potenciala.

Pri testiranju priprave vcepka smo ugotovili, da ima kultura izredno veliko potrebo po kisiku, zato smo se odločili testirati vpliv različne oskrbe s kisikom na produkcijo eritromicina, in gibanje vrednosti redoks potenciala v povezavi s potekom biopresova. Kar ni nepričakovano, smo ugotovili, da je pri limitaciji s kisikom produkcija eritromicina minimalna (23 mg/L). Pri poskusu biopresova kjer smo izvedli limitacijo s kisikom, ni bilo mogoče določati faz rasti, saj je bila po 20. urah biopresova krivulja DO_2 na 0 %, vrednosti redoks potenciala in pH vrednosti so počasi padali, medtem ko se glukoza ni porabila tekom biopresova in vrednosti PMV je variirala minimalno (Slika 16 in 17). Medtem ko

smo pri biopresusu vodenem pri optimalnih pogojih dovajanja kisika lahko prepoznali specifične faze rasti biomase in poteka samega biopresusa (Slika 18). Biosinteza eritromicina (donos) je bila pri biopresusu vodenem pri optimalnih pogojih dovajanja kisika skoraj 3,5x višja (73 mg/L) v primerjavi z biopresesom z limitacijo kisika. Pokazali smo, da je oskrba s kisikom nujno potrebna za dobro rast biomase in dobro biosintezo eritromicina.

Z dohranjevanjem glukoze smo želeli podaljšati fazo produkcije eritromicina. Glede na vrednosti DO₂, vrednost redoks potenciala in koncentracije glukoze pri izvedenih biopresesih, smo začeli dohranjevati glukozo v 35. uri biopresusa. V 35. uri biopresusa se glukoza, ki je bila prisotna v gojišču ni popolnoma asimilirala in kultura ni sprožila metabolne prilagoditve na sekundarni vir ogljika. Dodatek glukoze v 35. uri biopresusa ni bistveno vplival na gibanje vrednosti redoks potenciala in DO₂, opazili smo le manjši dvig v vrednosti pH (Slika 20) in stagnacijo vrednosti koncentracije prostih amonijevih ionov (Slika 21). Vendar je dodatek glukoze imel vpliv na dolžino stacionarne faze in kasnejši preklop v metabolizmu na sekundarni vir ogljika (porabo sojine moke ter koruzni škrob). Faza produkcije eritromicina se je pri biopresusu z dohranjevanjem podaljšala za približno 20 ur, kar je pozitivno vplivalo na končni donos eritromicina (Slika 20). Koncentracija eritromicina je bila pri biopresusu z dohranjevanjem ter postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka (72 mg/l) bistveno višja, kot pri kontrolnem biopresusu, kjer smo izvajali le postopen dvig hitrosti mešanja in pretoka zraka (42 mg/l). Vendar je bila koncentracija eritromicina pri biopresusu z dohranjevanjem skoraj enaka koncentraciji biosintetiziranega eritromicina pri biopresusu z najboljšo oskrbo s kisikom pri laboratorijskem bioreaktorju (73 mg/mL). Lahko ugotovimo, da je biopres proces produkcije eritromicina izredno odvisen od dostopnosti kisika, vendar lahko biosintezo eritromicina bistveno izboljšamo z dohranjevanjem in v kombinaciji s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja ter pretoka zraka.

Pri poskusih z različnimi načini vodenja biopresusa na laboratorijskih bioreaktorjih smo ugotovili glavne značilnosti poteka biopresesa biosinteze eritromicina. Pridobljena spoznanja smo želeli uporabiti pri biopresusu v 100 L pilotnem bioreaktorju z industrijskim sevom aktinomicete *S. erythaea* (Slika 22, 23), kjer smo biopres proces vodili s postopnim dvigovanjem hitrosti mešanja in pretoka zraka ter z konstantnim dohranjevanjem glukoze in vira dušika (amonijev sulfat). Zato se ta način vodenja biopresusa se uporablja pri industrijski proizvodnji eritromicina. Pri 20. uri biopresesa na pilotnem nivoju (100 L) se je že začela produkcija eritromicina, glukoza se je porabila v celoti, vrednosti DO₂ in redoks potenciala pa sta se hitro povisali (Slika 22). V 20. uri biopresusa se začne tudi neprekinjeno dohranjevanje majhnih koncentracij glukoze in se s tem vzdržuje nižja koncentracija glukoze (pod 0,05%), zato da se ne povzroči inhibicijo biosinteze eritromicina s pojavom katabolične represije. Ugotovili smo tudi, da se do 100. ure biopresusa trend gibanja redoks potenciala in odstotka raztopljenega kisika ujemata. K neprekinjeni produkciji eritromicina je bistveno pripomoglo vzdrževanje pH vrednosti pri

pH vrednosti okoli 7, ki je optimalna za produkcijo eritromicina (Elmahdi in sod., 2003; Mirjalili in sod., 1999) ter dohranjevanje nizkih koncentracij glukoze skozi cel bioprocес. Ugotovili smo, da je redoks potencial lahko eden izmed bioprosesnih parametrov, ki lahko bistveno pripomore pri optimizaciji bioprocesa. Čeprav izmerjene vrednosti redoks potenciala v biopresni brozgi odsevajo seštevek vseh redoks potencialov, njegove značilnosti ne morejo biti posplošene in zato je potrebno za vsak mikroben proces individualno preučiti vlogo redoks potenciala (Berovič in sod., 2000). Iz slike 24 lahko razberemo, da so trendi spremjanja vrednosti redoks potenciala med izpeljanimi biopresi različni, vendar lahko razberemo spremembe vrednosti redoks potencial, ki so se pojavile ne glede na način vodenja biopresa (tukaj izvzamemo biopres, ki je bil voden pri limitaciji s kisikom saj so vrednosti redoks potenciala konstantno padale). Vrednost redoks potenciala najprej pada na svojo minimalno vrednost med 20. in 30. uro biopresa. Po 20. do 40. urah gibanja redoks potenciala okoli minimalne vrednosti, pride do hitrega dviga vrednosti redoks potenciala (med 45. in 50. uro biopresa, oziroma pri dohranjevanju z glukozo pri 65. uri biopresa). Ta dvig v vrednosti redoks potenciala nakazuje na preklop metabolisma aktinomicete *S. erythaea* iz glukoze na sojino moko in koruzni škrob. Po približno 10. urah gibanja vrednosti redoks potenciala okoli določene vrednosti (od -100 mV do -50 mV) zopet padejo na minimalno vrednost redoks potenciala (od -250 mV do -100 mV), kar nakazuje na prilagoditev metabolisma aktinomicete na sekundarni vir ogljika. Proti koncu biopresa vrednosti redoks potenciala začnejo naraščati kar nakazuje na zmanjšanje metabolisma aktinomicete. Tako smo v tej magistrskem delu s pomočjo meritev redoks potenciala in spremjanja vrednosti DO₂, porabe glukoze, koncentracije prostih amonijevih ionov in vrednosti pH lahko določili posamezne faze rasti kulture, tvorbe biomase in ter določili optimalen čas v biopresu za dohranjevanje glukoze. Potrdili smo, da je biopres biosinteze eritromicina izredno odvisen od dostopnosti kisika. Glede na izvedene poskuse biopresov z različnimi načini vodenja, smo prišli do zaključka, da samo z redoks potencialom ne moremo voditi biopresa produkcije eritromicina, vendar je redoks potencial dober pokazatelj poteka biopresa, ki nam bistveno olajša razumevanje trenutnega stanja v poteku biopresa. Z merjenjem redoks potencialom je mogoče voditi biopres biosinteze eritromicina, vendar ob hkratnem sledenjem nekaterih drugih ključnih biopresnih parametrov, kot so vrednost pH, koncentracija prostih amonijevih ionov, koncentracija glukoze).

6 SKLEPI

Skladno s hipotezo, kjer smo predvideli:

- Da je submerzna aerobna produkcija streptomycetne biomase in biosinteza ciljnih metabolitov v mešalnem bioreaktorju odvisna od pogojev vodenja bioprocesa, kjer nas je posebej zanimala aeracija in dohranjevanje substrata.
- Posebno smo se osredotočili na metabolni redoks potenciala, pri čemer smo ugotovili s katerimi bioprosesnimi parametri (parcialni tlak kisika, prezračevanje, pH, mešanje) je mogoče vplivati na regulacijo celičnega metabolizma in s tem na optimizacijo procesa ter povisanja koncentracije produkta.

Tekom magistrskega dela smo določili/potrdili naslednje:

- V laboratorijskem merilu na stresalniku smo določili optimalna gojišča za produkcijo eritromicina z aktinomiceto *S. erythraea*.
- Potrdili smo hipotezo, da je pri biopresusu produkcija biomase in biosinteza eritromicina odvisna od učinkovite oskrbe s kisikom in dohranjevanja s substratom (glukozo). Pri izpeljanih poskusih z različnimi načini vodenja biopresov v laboratorijskem bioreaktorju smo z sledenjem redoks potenciala, DO_2 , vrednostjo pH, koncentracijo prostih amonijevih ionov in koncentracijo glukoze ugotovili, da je mogoče izboljšati biosintezo eritromicina z dobro oskrbo s kisikom in dohranjevanjem vira ogljika med biopresom.
- Postavljena hipoteza, da je mogoče s pomočjo sledenja vrednosti redoks potenciala ugotoviti, da je produkcija biomase in biosinteza eritromicina odvisna od oskrbe s kisikom in dohranjevanjem s substratom, je delno potrjena. Vrednost redoks potencial je dober pokazatelj stanja kulture med biopresom, vendar ugotavljam, da le z sledenjem vrednosti redoks potenciala ni mogoče optimalno voditi biopresu. Vendar je vrednost redoks potencial v kombinaciji s sledenjem drugih biopresnih parametrov (DO_2 , vrednost pH, koncentracija prostih amonijevih ionov, koncentracija glukoze) odličen kriterij s katerim lahko izvedemo optimizacijo in kasneje vodimo ustaljen biopres.

7 POVZETEK

V tem magistrskem delu smo preučevali vpliv dostopnosti kisika in dohranjevanja z glukozo na produkcijo izbranega sekundarnega metabolita eritromicina v laboratorijskem bioreaktorju, ter potencialno korelacijo med biosintezo eritromicina in vrednosti redoks potenciala in drugimi bioprosesnimi parametri tekom bioprocesa. Za testiranje, smo kot modelni organizem izbrali aktinomiceto *Saccharopolyspora erythraea*, ki proizvaja eden od pomembnih antibiotikov, eritromicin. V prvem delu magistrske naloge smo določili na izbor najboljše kombinacije gojišč za produkcijo eritromicina v laboratorijskem merilu z aktinomiceto *S. erythraea*. V nadaljevanju smo izvedli eksperimente v laboratorijskih bioreaktorjih, kjer smo testirali različno pripravo vcepk (enostopenjski in dvostopenjski), oskrbo s kisikom in dohranjevanje z glukozo. Pri vrednotenju teh različnih pristopov vodenja biopresesa v laboratorijskem bioreaktorju smo s pomočjo vrednosti redoks potenciala ter ostalih bioprosesnih parametrov kot so npr. DO₂, vrednost pH, koncentracija prostih amonijevih ionov in koncentracija glukoze ugotovili, da je biopreses za produkcijo eritromicina izredno občutljiv na limitacijo s kisikom. V primeru dolgotrajne limitacije s kisikom, se produkcija eritromicina začne pozneje in koncentracija proizvedenega eritromicina je nizka v primerjavi z dobro prezračevanim biopresesom, kjer vzdržujemo odtotek raztopljenega kisika s povečevanjem števila obratov mešal in/ali pa povečanjem pretoka zraka.

Poleg optimalnega dovajanja kisika je za dobro produkcijo eritromicina je pomembno tudi dohranjevanje z virom ogljika. Pokazali smo, da dohranjevanje z glukozo ima pozitiven vpliv na biosintezo eritromicina v laboratorijskem merilu. Optimizacija dohranjevanja z glukozo je zelo pomemben parameter vodenja biopresesa. Posebej se je to pokazalo pri biopresusu v pilotnem merilu, kjer je konstantno dohranjevanje z glukozo omogočilo neprekinjeno biosintezo eritromicina do 180. ure biopresesa. Dobra produkcija eritromicina je tudi posledica dobre dostopnosti kisika in vzdrževanja pH vrednosti okoli 7, ki je optimalna vrednost za produkcijo eritromicina. Pri vseh teh poskusih smo spremljali biopresesne parametre kot so npr. vrednost redoks potencial, pH, DO₂, rast biomase, itd., ki so pomemben pokazatelj celičnega metabolizma. Na podlagi rezultatov pridobljenih tekom tega dela lahko zaključimo, da je vrednost redoks potenciala, skupaj z ostalimi meritvami procesnih parametrov pomemben pokazatelj poteka biopresesa oz. tvorbe biomase in je uporaben parameter pri optimizaciji biopresesov. Merjenje PMV vrednosti ni omogočalo točnega ocenjevanja rasti biomase pri biopresusu produkcije eritromicina, kjer se uporablajo kompleksna gojišča. Pokazali smo tudi, da smo na regulacijo metabolizma aktinomicete lahko vplivali zelo močno s prezračevanjem, prav tako je dodatek glukoze med biopresesom imel pozitiven vpliv na večji končni donos eritromicina. Tako lahko zaključimo, da sta dobra oskrba s kisikom in dohranjevanje z glukozo izredno pomembna parametra za dobro produkcijo eritromicina ter da je redoks potencial zanimiv in uporaben parameter pri razvoju industrijskih proizvodnih biopresesov aktinomicet.

8 VIRI

- Angert E.R. 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature*, 3: 214–224
- Anderson A.S., Wellington E.M.H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 797–814
- Aparicio J.F., Molnar I., Schwecke T., König, Haydock S.F., Khaw L.E., Stauton J., Leadlay PF. 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: Analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*, 169, 1: 9–16
- Baerson S.R., Rimando A.M. 2007. A plethora of polyketides: Structures, biological activities, and enzymes. *Journal of American Chemical Society*, 10: 1–13
- Berovič M. 1987. Measurement of Redox Potential. Iz: Boris Kidrič Institute of Chemistry. Bioreactor Engineering Course, Otočec, Okt. 5. – 11.: 327-345.
- Berovič M., Rošelj M., Wondra M. 2000. Possibilities of redox potential regulation in submerged citric acid bioprocessing on beet molasses substrate. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 3: 193–201
- Bibb M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 142: 1335–1344
- Bibb M., 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 2: 208-215
- Cane D.E. 2010. Programming of erythromycin biosynthesis by a modular polyketide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 36: 27517–27523
- Chen Y., Deng W., Wu J., Qian J., Chu J., Zhuang Y., Zhang S., Liu W. 2008. Genetic modulation of the overexpression of tailoring genes eryK and eryG leading to the improvement of erythromycin A purity and production in *Saccharopolyspora erythraea* fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6: 1820–1828
- Chen Y., Huang M., Wang Z., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. 2013a. Controlling the feed rate of glucose and propanol for the enhancement of erythromycin production and exploration of propanol metabolism fate by quantitative metabolic flux analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 10: 1445-1453
- Chen Y., Wang Z., Zhuang Y., Zhang S., Yu X. 2013b. Significant decrease of broth viscosity and glucose consumption in erythromycin fermentation by dynamic regulation of ammonium sulfate and phosphate. *Bioresource Technology*, 134: 173–179
- Doumith M., Legrand R., Lang C., Salas J.A., Raynal M.-C. 1999. Interspecies complementation in *Saccharopolyspora erythraea*: elucidation of the function of *oleP*, *oleG1* and *oleG2* from the oleandomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces*

- antibioticus* and generation of new erythromycin derivate. Molecular Microbiology, 34, 5: 1039-1048
- El-Enshasy H.A., Mohames N. A., El-Diwany A. I. 2008. Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythrea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. Bioresource Technology, 99, 10: 4263–4268
- Elmahdi I., Banganz F., Dixon K., Harrop T., Sudgen D., Lye G.J. 2003. pH control in microwell fermentations of *S. erythraea* CA340: influence on biomass growth kinetics and erythromycin biosynthesis. Biochemical Engineering Journal, 16, 3: 299–310
- Greenberg R.C. 1998. Understanding the redox (rH_2) measurement of the biological terrain. Biomedical Therapy, 16, 1: 156–209
- Hamedi J., Malekzadeh F., Niknam V. 2002: Improved production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythrea* by various plant oils. Biotechnology Letters, 24, 9: 697–700
- Hamedi J., Malekzadeh F., Saghafi-nia A.E. 2004. Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils. Journal of industrial Microbiology and Biotechnology, 31, 10: 447–456
- Hamedi J., Khodagholi F., Hassani-Nasab A. 2005. Increased erythromycin production by alginate as a medium ingredient or immobilization support in cultures of *Saccharopolyspora erythrea*. Biotechnology Letters, 27, 9: 661–664
- Hamedi J., Makhdoumi Kakhki A., Darabi H. R. 2006. Suitable nonionic surfactants for the erythromycin production *Saccharopolyspora erythraea*. Journal of Science University of Tehran, 32, 1: 41–46
- Jacob H.-E. 1970. Redox potential. V: Methods in microbiology. Norris J. R. and Ribbons D.W. (eds.). 2nd edition. London, Academic Press: 91-123
- Kieser T., Bibb M., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. 2000. Practical streptomyces genetics. England, Jhon Innes Centre: 612 str.
- Kirm B., Magdevska V., Tome M., Horvat M., Karničar K., Petek M., Vidmar R., Baebler Š., Jamnik P., Fujs Š., Horvat J., Fonovič M., Turk B., Gruden K., Petković H., Kosec G. 2013. SACE_5999, a putative regulatory protein, is involved in morphological differentiation and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*, Microbial Cell Factories, 12, 1, 126: 1–15
- Klieneberger-Nobel E. 1947. The life cycle of sporing Actinomyces as revealed by study of their structure and separation. Journal of general microbiology, 1, 1: 22–32
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 249 str.
- Kukec A., Berović M., Čelan Š., Wondra M. 2002. The role of on-line redox potential measurement in Sauvignon blanc fermentation. Food Technology and Biotechnology, 40, 1: 49–55

- Kwong S.C., Rao G. 1991. Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 9: 1034–1040
- Kwong S.C., Randers L., Rao G. 1992. On-line assessment of metabolic activities based on culture redox potential and dissolved oxygen profiles during aerobic fermentation. *Biotechnology Progress*, 8, 6: 576–579
- Labeda D.P. 1987. Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* to the genus *Saccharopolyspora* as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythraeus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 1: 19–22
- Lee T.H., Chang Y.K., Chung B.H., Park Y.H. 1998. Correlation of redox potential with state variables in cultures under controlled dissolved oxygen concentration and pH. *Biotechnology Progress*, 14, 6: 959–962
- Lin Y.-H., Hwang S.-C. J., Gong J.T., Wu J.-Y., Chen K.-C. 2005. Using redox potential to detect microbial activities during clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters*, 27, 22: 1791–1795
- McNeil M.M., Brown J.M. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 3: 357–417
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th edition. New Jersey, Prentice-Hall: 1019 str.
- Majer J., Martin J.R., Egan R.S., Corcoran J.W. 1977. Antibiotic glycosides. 8. Erythromycin D, a new macrolide antibiotic. *Journal of American Chemistry Society*, 99, 5: 1620–1622
- Marcellin E., Mercer T.R., Licona-Cassani C., Palfreyman R.W., Dinger M.E., Steen J.A., Mattic J.S., Nielsen L.K. 2013. *Saccharopolyspora erythraea*'s genome is organized in high-order transcriptional regions mediated by targeted degradation at the metabolic switch. *BMC Genomics*, 14, 15: 1–9
- Minas W. 2005. Production of Erythromycin with *Saccharopolyspora erythrea*. V: Methods in Biotechnology, Microbial processes and products. Vol. 18. Barredo J. L. (ed.) Totowa, Humana Press: 65–89
- Miller E.S., Woese C.R., Brenner S. 1991. Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. strain NRRL B – 3381 as *Aeromicromyces erythreum* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 3: 363–368
- Mirjalili N., Zormpaidis V., Leadlay P. F. Ison A. P. 1999. The effect of rapeseed oil uptake on the production of erythromycin and triketide lactone by *Saccharopolyspora erythrea*. *Biotechnology Progress*, 15, 5: 911–918

- Mironov V.A., Sergirko O.V., Nastasyak I.N., Danielko V.N. 2004. Biogenesis and regulation of biosynthesis of erythromycins in *Saccharopolyspora erythrea*. Applied Biochemistry and Microbiology, 40, 6: 531–541
- Oliynyk M., Samborskyy M., Lester J.B., Mironenko T., Scott N., Dickens S., Haydock S.F., Leadlay P.F. 2007. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. Nature Biotechnology, 25, 4: 447-453
- Perdih A. 1996. Izvor in priprava substratov V: Biotehnologija osnova znanja. Raspored P. (ed.). Ljubljana, Bia d.o.o.: 367–382
- Pierú S., Menzella H.G., Rodriguez E., Carney J., Gramajo H. 2005. Production of the potent antibacterial polyketide erythromycin C in *Escherichia coli*. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 71, 5: 2539-2547
- Potvin J., Péringer P. 1993. Influence of n-propanol on growth and antibiotic production by an industrial strain of *Streptomyces erythreus* under different nutritional conditions. Biotechnology Letters, 15, 5: 455–460
- Reeves A.R., English R.S., Lampel J.S., Post D.A., Vanden Boom T.J. 1999. Transcriptional organization of the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea*. Journal of Bacteriology, 181, 22: 7098–7106
- Rostamza M., Noohi A., Hamedi J. 2008. Enhancement in production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by the use of suitable industrial seeding media. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 16, 1: 13–17
- Sánchez S., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Ávalos M., Guzmán-Trampe S., Rodríguez-Sanoja R., Langley E., Ruiz B. 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. The Journal of Antibiotics, 63, 8: 442–459
- Shuler M.L., Kargi F. 2008. Bioprocess engineering: basic concepts. 2nd ed. New York, Prentice Hall: 553 str.
- Stanzak R., Matsushima P., Baltz R.H., Rao R.N. 1986. Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of clustered erythromycin biosynthesis genes from *Streptomyces erythreus*. Nature Biotechnology, 4, 3: 229–232
- Stauton J., Wilkinson B. 1997. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. Chemical Reviews, 97, 7: 2611–22629
- Stauton J., Weissman K. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. The Royal Society of Chemistry. 18, 4: 380-416
- Summers R.G., Donadio S., Staver M.J., Wend-Pienkowski E., Hutchinson C.R., Katz L. 1997. Sequencing and mutagenesis in genes from the erythromycin biosynthetic gene

- cluster of *Saccharopolyspora eythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiology*, 143, 10: 3251–3262
- Tengerdy R.P. 1961. Redox potential changes in the 2-keto-L-gulonic acid fermentation—I. Correlation between redox potential and dissolved oxygen, *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 3, 3: 241–253
- User Manual: Autoclavable Bioreactor 2–7 liter. 1994. Nizozemska. Applikon, Applikon Dependable instruments (navodila za uporabo)
- Wardell J. N., Bushell M. E. 1999. Kinetics and manipulation of hyphal breakage and its effect on antibiotic production. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 3: 404–410
- Wiley P.F., Gale R., Pettinga C.W., Gerzon K. 1957a. Erythromycin. XII. The isolation, properties and partial structure of erythromycin C. *Journal of the American Chemical Society*, 79, 22: 6074–6077
- Wiley P.F., Grezon K., Flynn E.H., Sigal M.V., Weaver O., Quarck U.C., Chauvette R.R., Monahan R. 1957b. Erythromycin. X. Structure of erythromycin. *Journal of the American Chemical Society*, 79, 22: 6062–6070
- Wiley P.F., Sigal M.V., Weaver O., Monahan R., Gerzon K. 1957c. Erythromycin. XI. Structure of erythromycin B. *Journal of the American Chemical Society*, 79, 22: 6070–6074
- Zhang H., Wang Y., Wu J., Skalina K., Pfeifer B.A. 2010. Complete Biosynthesis of erythromycin A and designated analogs using *E. coli* as a heterologous host. Cell Press, *Chemistry & Biology*. 17: 1232–1240
- Zou X., Hang H., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. 2009. Enhancement of erythromycin A production with feeding available nitrogen sources in erythromycin biosynthesis phase. *Bioresource Technology*, 100, 13: 3358–3365

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. Marinu Beroviču, somentorju prof. Hrvoju Petkoviču in univ. dipl. ing. živ. teh. Štefanu Fujsu za vodenje in pomoč pri pisanju magistrske naloge. Posebna zahvala gre tudi Vasilki Magdevski in Katarini Karničar za tehnično pomoč pri izvedbi magistrske naloge na nivoju stresalnika. Zahvaljujem se tudi celotni ekipi pilotnega oddelka v podjetju Acies Bio d.o.o. za pomoč pri izvedbi poskusov v bioreaktorju. Hvala tudi podjetju Acies Bio d.o.o., ki mi je dalo na razpolago opremo in znanje za izvedbo magistrske naloge.

Hvala tudi moji družini in prijateljem za podporo pri izvedbi in pisanju magistrske naloge.

PRILOGA A

V prilogi A so sporulacijska gojišča, ki se niso uporabila v nadalnjih poskusih laboratorijskega dela.

Priloga A 1: Sestava sporulacijskega gojišča SM MgCl₂ (Kieser in sod., 2000).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Sojina moka	20	Cargill Foods
Manitol	20	Merck
Bakteriološki agar	20	Biolife
dH ₂ O	do 1L	
Po avtoklaviranju se doda		
1M MgCl ₂	6 mL/L	Fluka

* pH 7, sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Sojine moke se pri tem gojišču ne kuha. V steklenice z agarjem se razdeli po 300 ml gojišča, saj je SM gojišče nagnjeno k prevretju.

Priloga A 2: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-1 (El-Enshasy in sod., 2008).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Glukoza	4	Merck
Kvasni ekstrakt	4	Biolife
Sladni ekstrakt	10	Mercator
Bakterijski agar	20	Biolife
dH ₂ O	do 1L	

* pH 7, sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Priloga A 3: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-2 (Elmahdi in sod., 2003).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Tehnični agar	20	Biolife
EDTA	0,036	Sigma
Glukoza	2	Cargill Foods
Sojin pepton	5	Cargill Foods
Saharoza	1	Fluka
Kvasni ekstrakt	2,5	Biolife
dH ₂ O	do 1L	

* pH 7, sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Priloga A 4: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-5 (Mirjalili in sod., 1999).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Glukoza	2	
Saharoza	1	Fluka
Sojin pepton	5	Fluka
Kvasni ekstrakt	2,5	Biolife
Tehnični agar	20	Biolife

dH ₂ O	do 1L
-------------------	-------

* pH 7, sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa

Priloga A 5: Sestava sporulacijskega gojišča NERS-6 (Wardell in Bushell, 1999).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/L)	Proizvajalec
Paradižnikov pire	10	Mercator
Ovsena moka	10	Cargill Foods
Tehnični agar	20	Biolife
dH ₂ O	do 1L	

* pH 7, sterilizacija traja 20 minut pri 121°C in tlaku 120 kPa
Ovsena moka se kuha 20 minut pri 80°C v vodni kopeli.